

**Clóvis José Braz Júnior**

**Desenvolvimento e padronização de um teste ELISA para  
detecção de anticorpos (IgG) anti-*Anaplasma marginale* em  
bovinos submetidos ao processo de premunicação.**

**Dissertação apresentada à Escola  
de Veterinária da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para a obtenção  
do grau de mestre em Medicina  
Veterinária.**

**Área: Medicina Veterinária  
Preventiva**

**Orientadora: Lygia Maria Friche  
Passos**

**Belo Horizonte  
UFMG - Escola de Veterinária  
1996**



BIBLIOTECA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

23/04/97

107-03/100

MV-00008169-3

B827d Braz Júnior, Clóvis José, 1969-

Desenvolvimento e padronização de um teste ELISA para detecção de anticorpos (IgG) anti-*Anaplasma marginale* em bovinos submetidos ao processo de premunicação./ Clóvis José Braz Júnior.- Belo Horizonte: UFMG. Escola de Veterinária, 1996.

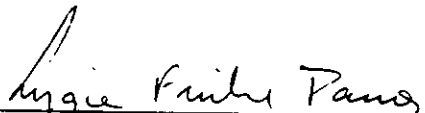
66p.: il.


Dissertação (Mestrado)

1- Bovino-Doenças-Diagnóstico-Teses. 2- Ensaio imunoenzimático-Teses. 3- Anaplasmose-Identificação-Teses. 4- ELISA-Teses. I. Título.

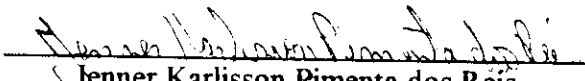
CDD- 636.208 969 6

Dissertação defendida e aprovada em 29/11/96, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Lygia Maria Friche Passos  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. José Divino Lima

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Múcio Flávio Barbosa Ribeiro

  
\_\_\_\_\_  
Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Dedico este trabalho a minha família,  
à Cleide  
e ao povo brasileiro.

“ Heróis mesmo são os homens que suportam as suas vidas e são pacientes com o que os heróis dos livros andaram a fazer.”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, nosso criador!

Ao Prof. José Divino, grande amigo, mestre incomparável e profissional exemplar.

Ao Prof. Múcio, pela execução dos trabalhos de microscopia eletrônica.

À Profa. Lygia meu agradecimento pela confiança e consideração.

À Cleide pelo total apoio, entusiasmo e companheirismo.

Aos amigos e colegas do curso de pós-graduação por todos aqueles momentos alegres e descontraídos. Muita saudade!

Ao amigo Marcelo “dabronha” pela convivência, “pingaiadas” e pela sonoplastia no departamento.

À Nádia meu agradecimento pela paciência e dedicação.

À D. Sônia e todos aqueles que me ajudaram, motivaram e fizeram presença nesta etapa tão importante.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	13
<b>LISTA DE TABELAS</b>	15
<b>RESUMO</b>	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
3.1 Infecção experimental para produção de antígeno	32
3.2 Desenvolvimento e padronização do teste ELISA	32
3.2.1 Preparações antigênicas	32
3.2.2 Teste ELISA	36
3.2.3 Validação do teste ELISA	37
3.2.4 Banco de Soros	37
3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta-RIFI	38
3.3.1 Preparação do antígeno	38
3.3.2 Procedimento da RIFI	39
3.4 Análise Estatística	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	41
4.1 Preparações Antigênicas	41
4.2 Determinação da diluição ótima do antígeno, soro e conjugado	45
4.3 Determinação do Valor Discriminante	46
4.4 Validação do teste ELISA	46
<b>5 CONCLUSÕES</b>	52

<b>SUMMARY</b>	<u>54</u>
<b>APÊNDICE</b>	<u>56</u>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<u>58</u>



## LISTA DE FIGURAS

	<b>PÁG.</b>
FIGURA 1. Representação esquemática da produção das preparações antigênicas de <i>Anaplasma marginale</i> para o teste ELISA.	36
FIGURA 2. Eletromicrofotografia do corpúsculo de <i>A. marginale</i> preparado pela filtração em coluna de areia do mar a partir de hemácias parasitadas, congeladas com DMSO 30% em PBS após sonicação.	43
FIGURA 3. Eletromicrofotografia de preparados de hemácias parasitadas por <i>A. marginale</i> .	45



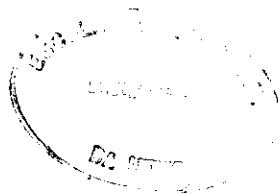
## LISTA DE TABELAS

	PÁG.
TABELA 1. Número de amostras de soro bovino por categoria, testados no ELISA.	39
TABELA 2. Valores de absorvância em filtro 492 nm dos soros de bovinos negativos e positivos frente a diluições do antígeno de <i>A. marginale</i> (DMSO/AREIA) para o teste ELISA.	46
TABELA 3. Relação positivo/negativo dos valores de absorvância de soros de bovinos frente ao antígeno de <i>A. marginale</i> (DMSO/AREIA) para o teste ELISA.	47
TABELA 4. Comparação através dos resultados da Tabela de Contingência 2x2 entre o ELISA e a RIFI na detecção de anticorpos anti- <i>A. marginale</i> em amostras de soro de bovinos importados e submetidos ao processo de premunicação.	48
TABELA 5. Comparação através dos resultados da Tabela de Contingência 2x2 entre o ELISA e a RIFI na detecção de anticorpos anti- <i>A. marginale</i> em 55 amostras de soro de bovinos de campo.	51

## RESUMO

Um sistema ELISA usando antígeno bruto foi desenvolvido para detecção de anticorpos anti-*A. marginale* no soro de bovinos. O antígeno foi produzido a partir do sangue de um bezerro esplenectomizado e previamente inoculado com  $5 \times 10^8$  hemácias parasitadas, preservadas em nitrogênio líquido. Durante o pico da parasitemia, o sangue foi colhido e, após centrifugação, o plasma e a camada de leucócitos foram descartados. O sedimento obtido foi dividido em duas partes. Em uma parte os leucócitos foram eliminados pela filtração através de coluna contendo areia do mar. Após a filtração, uma porção do material filtrado foi congelada a  $-70^\circ\text{C}$  com DMSO 30% em PBS. A outra porção do material filtrado foi lisada com uma solução de cloreto de amônia ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 0,9% e congelada a  $-20^\circ\text{C}$ . A parte do sedimento inicial não filtrada em coluna de areia foi também dividida em duas porções onde uma foi congelada com DMSO 30% e a outra lisada com uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,9%. Posteriormente todas as preparações foram sonicadas e os sedimentos obtidos após centrifugação foram solubilizados com Triton X-100. Após a sonicação as preparações foram examinadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Estruturas típicas do *Anaplasma* foram visualizadas apenas na preparação antigênica filtrada através da coluna de areia e congelada com DMSO. Diluições ótimas do antígeno e soros referência positivo e negativo foram determinadas por titulação em bloco e o valor discriminante ("cut off") foi determinado pela média da leitura de 39 soros negativos acrescida de dois desvios-padrão. O exame de 337 amostras de soro de bovinos importados e submetidos ao processo de premunicação indicou que o ELISA apresentou maior especificidade (94,87%) que a reação de imunofluorescência indireta (71,79%).

Palavras-chave: ELISA, *Anaplasma marginale*, bovinos, premunição.



## 1 INTRODUÇÃO

Os hemoparasitas estão entre os principais patógenos dos animais domésticos (Wright, 1990; Alonso et al., 1992). Anaplasmosose é uma hemoparasitose dos bovinos e outros ruminantes cujo agente etiológico é uma rickettsia intraeritrocítica do gênero *Anaplasma*, pertencente à família Anaplasmataceae da ordem Rickettsiales (Bergey's Manual, 1984). No Brasil, a espécie que causa a doença nos bovinos é o *Anaplasma marginale*. A anaplasmosose está distribuída por todo o mundo, sendo responsável por grandes perdas na produção de carne e leite. A doença, originalmente descrita por Theiler em 1910, caracteriza-se por uma anemia severa associada ao parasitismo intraeritrocitário (Ristic, 1968; Palmer & McGuire, 1984; Wright, 1990; Alonso et al., 1992).

Os graves obstáculos à produção pecuária atribuídos à anaplasmosose nos países em desenvolvimento e nos EUA, juntamente com os métodos imunoproláticos ineficientes reforçam a necessidade de estudos sobre a anaplasmosose, seu agente, a busca de métodos imunoproláticos e técnicas imunodiagnósticas mais eficientes (Palmer & McGuire, 1984; Wright et al., 1993).

Nos países onde a anaplasmosose e outras hemoparasitoses são prevalentes, a necessidade de testes específicos para o diagnóstico dessas doenças é um problema real (Duzgun et al., 1988).

Os estudos epidemiológicos da anaplasmosose têm sido limitados pela falta de ensaios diagnósticos apropriados para o grande número de animais portadores. O desenvolvimento de técnicas sorológicas rápidas, simples, sensíveis, específicas e com leitura automatizada abre novas oportunidades para pesquisas das doenças

causadas por hemoparasitas (Thoen et al., 1980; Montenegro-James et al., 1990; Palmer, 1991; Venkatesan & Wakelin, 1993).

Embora várias técnicas sorológicas tenham sido desenvolvidas para detecção de anticorpos anti-*A. marginale*, algumas delas apresentam baixa sensibilidade e especificidade ou requerem equipamentos especializados e sua padronização é complexa. Consequentemente o seu uso na rotina fica impraticável. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), é amplamente usada para o diagnóstico da anaplasmosose e embora seja um teste sensível pode levar a resultados falso positivos. As reações inespecíficas que podem ser observadas exigem do técnico experiência para a leitura e distinção entre as reações positivas e aquelas inespecíficas. O Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) é um teste simples, rápido, sensível e com boa especificidade. A leitura automatizada permite o exame de grande número de amostras com o mínimo de subjetividade e o máximo de homogeneidade (Bidwell et al., 1978; Thoen et al., 1980; Goff et al., 1985; Winkler et al., 1987; Kroon et al., 1990).

Há um consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade da padronização internacional de protocolos e reagentes do ELISA como técnica imunodiagnóstica das doenças infecciosas em veterinária (Wright et al., 1993).

No estado de Minas Gerais, a anaplasmosose bovina tem sido considerada uma das doenças de maior importância na pecuária, constituindo um dos fatores limitantes à criação de bezerros (Ribeiro et al., 1983).

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema ELISA para detecção de anticorpos (IgG) anti-*A. marginale* em bovinos submetidos ao processo de premunicação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A mais de meio século atrás, os corpos pontiformes que apareciam nos eritrócitos de bovinos que sofriam de uma anemia infecciosa aguda, foram chamados de *Anaplasma marginale*. O termo *Anaplasma* foi sugerido em razão do agente, à microscopia óptica, ser desprovido de citoplasma enquanto o termo *marginale* indica a localização periférica dentro dos eritrócitos (Ristic, 1968).

Os corpos do *Anaplasma* geralmente localizam-se na margem dos eritrócitos, medindo entre 0,3 a 1,0  $\mu$  de diâmetro e são constituídos de uma membrana externa simples limitando um a oito corpúsculos iniciais que medem entre 300 a 400  $\mu$ m de diâmetro sendo envoltos por membranas duplas. Os corpúsculos iniciais apresentam material granular central elétron-denso do qual partem filamentos em direção ao limite das membranas e constituem a unidade infectante do *A. marginale* (Ristic, 1968). Esta subparticularização sugere a reprodução por divisão binária (Scott et al., 1961; Amerault et al., 1975; Kocan et al., 1978; Palmer & McGuire 1984; Patarroyo et al., 1987; Ribeiro & Lima, 1996). Além da divisão binária, Summers & Padgett (1970) e Ribeiro (1991) observaram projeções protoplasmáticas semelhantes ao brotamento.

O *A. marginale* é considerado um parasita obrigatório dos ruminantes, transmitido por vetores artrópodes, sendo os carrapatos os prováveis vetores biológicos e os outros artrópodes, moscas (*Tabanidae* e *Stomoxys*) e mosquitos (*Psorophora*), vetores mecânicos (Wanduragala & Ristic, 1993; Ribeiro & Lima, 1996). A transmissão congênita foi relatada por Passos & Lima (1984) e por Ribeiro et al. (1995).

A influência do *Boophilus microplus* na epidemiologia da anaplasmose não está totalmente esclarecida (Alonso et al., 1992; Guglielmone, 1995) embora Ribeiro & Lima (1996) tenham observado o desenvolvimento do *A. marginale* em fêmeas do *B. microplus*. Em algumas regiões a distribuição geográfica da anaplasmose é mais difundida que a presença do carrapato, sugerindo a existência de outros vetores. A variedade de dípteros hematófagos em relação ao carrapato também sugere a existência de outros vetores (Alonso et al., 1992; Guglielmone, 1995).

No hospedeiro vertebrado o local de multiplicação do *Anaplasma* é o eritrócito maduro, não tendo sido demonstrado estágios de desenvolvimento extraeritrocitários. O corpúsculo inicial entra no eritrócito por vacuolização pinocítica. A interação entre o corpúsculo e a membrana do eritrócito ocorre por meio de proteínas de superfície que têm afinidade por glicoproteínas da superfície do eritrócito. A multiplicação dos corpúsculos diminui a concentração de fosfolípidos do citoplasma do eritrócito e aumenta a concentração de ácido siálico, resultando na perda de função e envelhecimento precoce do eritrócito (Wanduragala & Ristic, 1993).

Os animais jovens são mais resistentes às hemoparasitoses (Ristic, 1968; Alonso et al., 1992; Wanduragala & Ristic, 1993; Guglielmone, 1995). No Estado de Minas Gerais a anaplasmose é endêmica e os animais geralmente adquirem a infecção quando jovens, apresentando parasitemia moderada, com decréscimo significativo do volume globular. Os bezerros que se recuperam permanecem portadores com baixa parasitemia (Ribeiro & Reis, 1981). Ribeiro et al. (1984) identificaram, através da RIFI, uma alta porcentagem de animais adultos suscetíveis à anaplasmose. Os autores deduziram que a transmissão da doença não é constante durante o ano, causando instabilidade na endemicidade. Numa situação de estabilidade, a interação entre artrópodes hematófagos, hemoparasitas e bovino é significativa o bastante para permitir uma infecção precoce enquanto os bezerros estão protegidos pelos



anticorpos colostrais, pela maior atividade eritropoiética da medula óssea, pela imunidade celular e pela função protetora da hemoglobina fetal. Nos casos de instabilidade, este equilíbrio é quebrado de modo que alguns bezerros não têm este contato prévio com os hemoparasitas, tornando-se suscetíveis. Segundo Madruga et al. (1984) a incidência da doença em bezerros de 1 a 4 meses ocorre provavelmente devido à queda nos níveis de anticorpos colostrais por volta do 28<sup>o</sup> ao 84<sup>o</sup> dia após o nascimento. Fatores como clima, raça, uso de acaricidas, rotação de pastagens, estresse e o manejo dos bezerros desequilibram aquela interação, contribuindo para a instabilidade. Nas regiões onde a estação fria prolonga-se com temperaturas abaixo de 15°C, o desenvolvimento dos artrópodes fica prejudicado (Gonzales, 1993) e a flutuação populacional destes artrópodes por sua vez modula a taxa de transmissão dos hemoparasitas. Estudos comparativos entre *Bos taurus* e *Bos indicus* indicam que as raças zebuínas mantêm baixas parasitemias de hemoparasitas, havendo uma relação direta entre instabilidade e grau de sangue (Alonso et al., 1992; Guglielmono, 1995).

Após a recuperação de uma infecção por *A. marginale*, os animais tornam-se parcialmente ou totalmente imunes a desafios subsequentes. Nestes animais, cepas virulentas e heterólogas podem causar baixas parasitemias (Wright, 1990; Alonso et al., 1992; Wanduragala & Ristic, 1993).

A imunidade protetora para a anaplasmose foi tradicionalmente associada com premunicação, ou seja, a contínua presença do *Anaplasma* em baixos níveis nos animais recuperados da doença (Wanduragala & Ristic, 1993). O mecanismo exato da imunidade não é conhecido, embora alguns mecanismos tenham sido propostos, tais como a ação de anticorpos bloqueadores dos corpúsculos iniciais do *Anaplasma*, quebra direta dos corpúsculos por anticorpos e pelo complemento e finalmente a fagocitose e morte intra-eritrocitária dos corpúsculos e dos eritrócitos

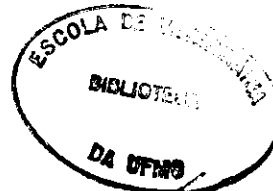
fagocitados. Há evidências sugerindo que macrófagos e ou células T “helper” estejam também envolvidas no processo da resposta imune (Wright, 1990). Segundo (Ristic, 1968 e Wanduragala & Ristic, 1993), as evidências acumuladas ao longo dos anos mostram que a resposta imune contra a anaplasnose é uma associação entre as respostas humoral, caracterizada pela produção de anticorpos e celular, caracterizada pela ativação da proliferação e hipertrofia de macrófagos da cadeia esplênica, das células de Kupffer no fígado e das células reticulares da medula óssea. Além disso, Ristic (1968), afirma que todos os processos imunopatológicos, inclusive a anemia, parecem ser essenciais para o desenvolvimento da premunicação.

Murphy et al. (1966) investigaram o aparecimento das classes de imunoglobulinas na resposta à infecção pelo *A. marginale*, usando a cromatografia de troca aniônica. A atividade dos anticorpos é exclusiva das imunoglobulinas M (IgM) nos primeiros 4 a 5 dias após o início da síntese de anticorpos e clinicamente, os animais apresentam os primeiros sinais da doença patente. Aproximadamente trinta dias após a crise hemolítica, a distribuição humoral é 25% IgG e 75% IgM. Na fase crônica da doença a atividade é da IgG.

Wilson et al. (1978) detectaram anticorpos anti-*A. marginale* no sétimo dia após a inoculação, através da RIFI. Kroon et al. (1990) e Löss et al. (1992) usando a RIFI, detectaram estes anticorpos entre três e dez dias e 14 dias após a inoculação, respectivamente.

Vários métodos sorológicos têm sido usados para o diagnóstico da anaplasnose em bovinos (Wright, 1990).

O teste de Fixação do Complemento (FC) utiliza como antígeno os corpúsculos de *A. marginale*, os quais são separados dos eritrócitos por lise e depois lavados, ficando livres da hemoglobina e debrís celulares. Atualmente, técnicas de microtitulação têm sido usadas consumindo pequenas quantidades de reagentes. No teste FC é



essencial que todos os reagentes estejam corretamente padronizados e o teste rigorosamente controlado (Wright, 1990).

No teste da Aglutinação no Cartão (TC), após a mistura de quantidades padronizadas do antígeno e do soro-teste na área do cartão o grau de aglutinação é avaliado visualmente. A vantagem do AC é que ele pode ser realizado no laboratório ou no campo e o resultado é avaliado rapidamente (Wright, 1990).

O teste da Aglutinação em Tubo Capilar (AC) fundamenta-se na avaliação do grau de aglutinação que ocorre quando o antígeno, corpúsculos de *A. marginale* parcialmente purificados, é misturado com o soro-teste em um tubo capilar (Wright, 1990).

O teste Radioimunoensaio (RIA) apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA, mas requer equipamentos laboratoriais mais sofisticados, sendo este último preferido na maioria das circunstâncias (Wright, 1990).

A RIFI tem como maior problema as reações inespecíficas. Além disso, devido ao limitado número de testes que podem ser executados por um operador em um dia, outros testes são geralmente preferidos. O antígeno são hemácias parasitadas distribuídas sobre uma lâmina de vidro na forma de esfregaços (Wright, 1990).

O ELISA é um teste simples, rápido, sensível e de alta especificidade. A leitura automatizada permite o exame de grande número de amostras com o mínimo de subjetividade e o máximo de homogeneidade (Bidwell et al., 1978; Thoen et al., 1980; Goff et al., 1985; Winkler et al., 1987; Kroon et al., 1990).

No teste ELISA a fase sólida, usualmente uma placa plástica de microtitulação é coberta com o antígeno. Sobre o antígeno é colocado, em diferentes etapas o soro-teste, uma anti-imunoglobulina, o conjugado enzimático e o substrato dessa

enzima. A alteração deste substrato é perceptível por mudança na coloração do sistema. O resultado final pode ser avaliado visualmente ou através de espectrofotometria e expresso em absorbância num dado comprimento de onda (Voller, 1976; Venkatesan & Wakelin, 1993).

Wilson et al. (1978) compararam os testes FC, AC, TC e RIFI e concluíram que todos eles apresentam elevada especificidade com 86,6% de concordância. O TC foi o mais rápido (resultados obtidos em 10 minutos), porém o menos específico. O FC foi mais eficiente na detecção de soros reagentes, portanto o mais sensível. A RIFI foi indicada como instrumento de pesquisa em circunstâncias específicas onde são requeridas titulações.

Bidwell et al. (1978) demonstraram as vantagens do ELISA sobre a RIFI. O ELISA foi preferível devido ao fato de sua menor subjetividade na leitura e interpretação dos resultados, tendo maior sensibilidade, permitindo também o exame de maior número de amostras. Na RIFI, a exposição à fonte de luz ultra-violeta é desgastante, tornando o técnico mais suscetível a erros.

Thoen et al. (1980) e Winkler et al. (1987) compararam o FC com o teste ELISA. Os autores concordaram que o maior problema com o FC para uso no diagnóstico da anaplasmosose foi a sua complexidade. A sua padronização requer muito tempo. A maior vantagem do ELISA foi a simplicidade no procedimento, rapidez, confiabilidade, podendo ser lido automaticamente mantendo a uniformidade nas condições do teste mesmo quando no exame de grande número de amostras.

Conforme Goff et al. (1985) e Kroon et al. (1990) embora a RIFI seja muito sensível, há problemas com a especificidade. Segundo os autores os problemas com a RIFI incluem as fluorescências inespecíficas que dificultam a análise visual, tornando o teste muito subjetivo. Estes problemas ocorrem devido à presença de precipitados no soro e aos anticorpos inespecíficos e auto-

anticorpos contra membranas de hemácias. Montenegro-James et al. (1985) também apontam as reações inespecíficas como responsáveis pelo alto "background" verificado na RIFI, onde as opsoninas se fixam sobre os eritrócitos prejudicando a especificidade do teste. Opsoninas são hemaglutininas classificadas como beta-2-M globulinas produzidas durante as fases aguda e convalescente da infecção (Ristic, 1968).

Segundo Barry et al. (1986), não há testes satisfatórios para o diagnóstico da anaplasnose. A RIFI detecta fluorescências inespecíficas e o FC além das reações inespecíficas, falha em detectar anticorpos em animais portadores após três meses da infecção.

O FC e o TC são métodos usados frequentemente nos EUA. O TC é um procedimento rápido e tem sido usado com sucesso para detecção de animais positivos. O FC mostrou-se adequadamente sensível e específico, embora sua aplicação seja limitada devido a sua complexidade. O ELISA mostrou-se mais vantajoso que o FC pelo uso mínimo de reagentes e interpretação objetiva dos resultados (Robles et al., 1986; Thoen et al., 1980).

O FC, é uma técnica complexa e consome muito tempo, sugerindo a necessidade de um método simples, rápido e mais sensível. O ELISA é superior ao FC por ser mais sensível, detectando reações por mais tempo que o FC (Nakamura et al., 1988).

Conforme Shkap et al. (1990), o teste ELISA oferece vantagens quando comparado com a RIFI. Além de possuir alta especificidade, o ELISA requer volumes menores de antígeno e a sua padronização permite a obtenção de resultados uniformes. O registro dos resultados automaticamente permite o emprego deste teste em enquetes sorológicas.

Montenegro-James et al. (1990) usaram o Dot-ELISA para detecção de anticorpos anti-A. *marginale*. Neste ensaio

imunoenzimático foi aplicado 25 ng de antígeno sobre discos de nitrocelulose e o complexo antígeno-anticorpo foi detectado pelo uso da Proteína A conjugada à fosfatase alcalina. As reações foram visualizadas após a adição do substrato cromogênico. Este teste permite o processamento de várias amostras de soro e os resultados são obtidos em menos de três horas, com sensibilidade similar à RIFI. Segundo os autores, o Dot-ELISA foi mais fácil, seguro e com interpretação dos resultados mais objetiva que a RIFI, além do fato de não ter sido observado reação cruzada com *Babesia* sp.

Su & Hsu (1993) compararam o FC, RIFI e ELISA, usando a mesma cepa de *A. marginale* para produção dos respectivos antígenos. O ELISA quando comparado com o FC foi mais sensível, apresentando 94,4% e 89,1% respectivamente. O FC foi mais sensível quando comparado à RIFI apresentando 87,9% e 73,9%, respectivamente.

Diferentes métodos têm sido empregados na tentativa de se produzir testes ELISA para o diagnóstico da anaplasmoze, seja diretamente pela captura do agente (Trueblood et al., 1991) ou para detecção de anticorpos circulantes (Thoen et al., 1980; Barry et al., 1986; Winkler et al., 1987; Duzgun et al., 1988; Nakamura et al., 1988; Montenegro-James et al., 1990; Shkap et al., 1990; Su & Hsu, 1993).

Segundo Duzgun et al. (1988) a alta especificidade alcançada pelo seu teste ELISA, foi devido ao uso de dois antígenos, um com eritrócitos parasitados e outro com eritrócitos de animais sabidamente livres, promovendo-se a pré-adsorção do soro com este antígeno de hemácias livres de parasitas. Schuntner & Leatch (1988), trabalhando com Radioimunoensaio (RIA), eliminaram os problemas com reações cruzadas sem perdas na sensibilidade adotando também o segundo antígeno, produzido com hemácias livres de infecções por hemoparasitas. Antes do teste, cada amostra

de soro foi incubada em um meio contendo a preparação de hemácias livres e uma preparação de hemácias infectadas com *Babesia bovis*.

Conforme Barry et al. (1986), Duzgun et al. (1988) e Shkap et al. (1990), no ELISA algumas reações cruzadas ocorrem devido a presença de anticorpos contra resíduos de hemácias presentes nos corpúsculos iniciais parcialmente purificados, mas que não interferiram na especificidade dos resultados. Passos (1993) também cita em seus experimentos com *Babesia* sp, incrementos nos valores de absorvância devido a reações cruzadas induzidas por componentes de hemácias presentes nas preparações antigênicas. Segundo Schuntner & Leatch (1988), as reações cruzadas induzem resultados falso-positivos, reduzindo a eficiência do teste para uso em áreas onde existem outras hemoparasitoses concorrentes.

Winkler et al. (1987) conseguiram maior sensibilidade e menor "background" nos valores da absorvância, ao submeterem uma preparação antigênica a pré-tratamento com Sódio Dodecil Sulfato (SDS). A possível explicação para estes resultados seria a obtenção de acessos a pontos antigênicos adicionais e à desnaturação protéica promovida pelo tratamento com o SDS.

As metodologias usadas para purificação de corpúsculos iniciais de *A. marginale* são variadas.

Palmer & McGuire (1984) realizaram a lise das hemácias através do congelamento com DMSO 30% em PBS. A sonicação do material lisado foi realizada em amplitude de 50W no desintegrador ultrasônico. Os autores descartaram o sobrenadante obtido e utilizaram o sedimento como porção purificada de corpúsculos iniciais.

No ELISA padronizado por Barry et al. (1986), o sobrenadante

obtido após a sonicação e centrifugação da preparação antigênica foi usado como porção purificada de corpúsculos iniciais e o sedimento descartado.

No experimento de Duzgun et al. (1988), a sonicação do material lisado foi realizada em amplitude de 100W no desintegrador ultrasônico. Os autores não separaram as fases sedimento/precipitado após a sonicação. Para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas os autores usaram soro de coelho a 1%.

Nakamura et al. (1988) fizeram a lise das hemácias através da descompressão com N<sub>2</sub> e com Triton X-100. A sonicação do material lisado foi realizada em amplitude de 35W no desintegrador ultrasônico. Estes autores descartaram o sobrenadante obtido e utilizaram o sedimento como porção purificada de corpúsculos iniciais. Os autores não usaram bloqueio para os sítios de ligações inespecíficas.

Nos ensaios de Shkap et al. (1990), a lise das hemácias foi feita através do congelamento com DMSO 30% em PBS e a sonicação do material lisado foi realizada em amplitude de 100W no desintegrador ultrasônico. Estes autores descartaram o sobrenadante obtido e utilizaram o sedimento como porção purificada de corpúsculos iniciais. Para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas os autores usaram soro equino a 5% em PBS.

Montenegro-James et al. (1990) fizeram a lise das hemácias através do congelamento-aquecimento e depois usaram NP-40. A sonicação do material lisado foi realizada em amplitude de 20W no desintegrador ultrasônico. Os autores descartaram o sobrenadante obtido e utilizaram o sedimento como porção purificada de corpúsculos iniciais.

Patarroyo et al. (1994) fizeram a lise das hemácias através do uso de uma solução de lise composta de Tris, EDTA, PMSF, TLCK e



NP-40. A sonicação do material lisado foi realizada em amplitude de 25W no desintegrador ultrasônico. Os autores descartaram o sobrenadante obtido e utilizaram o sedimento como porção purificada de corpúsculos iniciais.

Para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas Trueblood et al. (1991), usaram leite desnatado a 5% em PBS.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Infecção experimental para produção de antígeno

Um bezerro da raça Holandesa, livre de infecção por hemoparasitos e adquirido antes de mamar o colostro foi esplenectomizado e inoculado, aproximadamente à terceira semana de vida, via subcutânea com um número aproximado de  $5 \times 10^8$  hemácias parasitadas por *A. marginale*, conservadas em N<sub>2</sub> (amostra isolada no município de Capim Branco-MG) (Löss, et al., 1992). O bezerro foi mantido em isolamento e examinado diariamente através de esfregaços sanguíneos, hematócrito e temperatura retal.

#### 3.2 Desenvolvimento e padronização do teste ELISA

##### 3.2.1 Preparações antigênicas

Um volume de 1.500 ml de sangue foi colhido do bezerro experimentalmente inoculado na fase ascendente da parasitemia. O sangue foi desfibrinado com pérolas de vidro e centrifugado a 1.000 g por 15 minutos a 4°C. O plasma e a camada de leucócitos foram desprezados. As hemácias foram lavadas em tampão salina fosfatada (PBS) três vezes por centrifugação a 1.000 g por 15 minutos a 4°C e o sedimento foi separado em duas partes.

Uma das partes acima, foi ressuspensa em dois volumes de PBS e filtrada em coluna contendo areia do mar (1.000 cm<sup>3</sup>), para eliminação dos leucócitos restantes (Passos et al., 1995). Essa porção filtrada em areia foi dividida em duas alíquotas onde uma foi congelada a -70°C com igual volume de Dimetil Sulfóxido (DMSO)

30% em PBS (Palmer & McGuire, 1984 e Shkap et al., 1990). A segunda alíquota, foi lisada com cinco volumes de uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 0,9% por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lise, o material foi lavado e centrifugado a 1.000 g por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi reconstituído em mesmo volume de PBS e armazenado a -20°C.

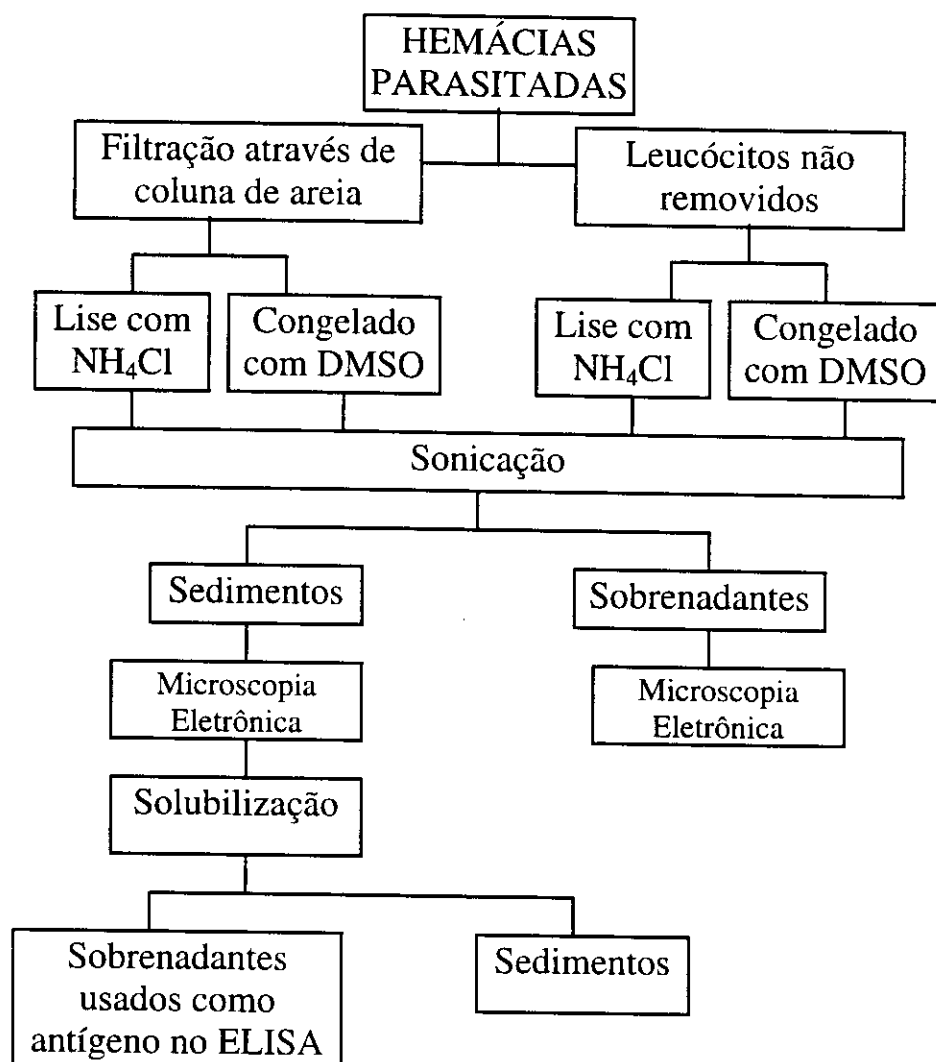
A outra porção do sedimento inicial, que não foi filtrada em coluna de areia foi também dividida em duas alíquotas, onde uma delas foi congelada a -70°C com igual volume de DMSO 30% em PBS. A segunda alíquota foi lisada com cinco volumes de uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 0,9% por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a lise, o material foi lavado e centrifugado nas condições citadas anteriormente. O sedimento foi reconstituído em mesmo volume de PBS e armazenado a -20°C.

Posteriormente, todas as preparações antigênicas foram descongeladas à temperatura ambiente e lavadas por três vezes em PBS a 4°C por centrifugação a 1.000 g por 15 minutos a 4°C. Após as lavagens, o sedimento final de cada preparação foi reconstituído em dois volumes de PBS e sonicado em amplitude 50W com três ciclos de um minuto cada, em desintegrador ultrasônico 100W. Após a sonicação as preparações foram centrifugadas a 10.000 g por cinco minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram solubilizados com o mesmo volume de uma solução de detergente TRITON X-100 a 4% em PBS, a 4°C por três horas (Nakamura et al., 1988). Após a solubilização, as preparações foram centrifugadas a 10.000 g por três minutos em microcentrífuga. Os sobrenadantes assim obtidos foram armazenados em alíquotas.

Amostras das preparações antigênicas foram examinadas através de microscopia eletrônica de transmissão no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG utilizando técnica usada por Ribeiro & Lima (1996).

A Figura 1 resume esquematicamente a produção das preparações antigênicas de *A. marginale* para o ELISA.

FIGURA 1: Representação esquemática da produção das preparações antigênicas de *A. marginale* para o teste ELISA.



A microscopia eletrônica serviu de base para a escolha da preparação antigênica a ser testada no ELISA. Através de diluições seriadas a partir de 1:100 em PBS-Tween 20 (PBST) frente a várias diluições de amostras de soros positivos e negativos, foram padronizadas as diluições do antígeno e dos soros-teste.

### 3.2.2 Teste ELISA

Placas para ELISA (Difco) foram sensibilizadas com o antígeno em solução tampão carbonato/bicarbonato, (pH 9,6) e incubadas por 15 horas a 4°C. Após este tempo, as placas foram lavadas por três vezes com PBST (pH 7,2). Os sítios de ligações inespecíficas foram bloqueados com uma solução de PBST contendo 5% de soro equino a 37°C por 1 hora. Depois de três lavagens com PBST, as placas foram incubadas a 37°C por 1 hora com as amostras de soros-teste em duplicatas e soros controles positivo e negativo quaduplicadas diluídos 1:100 em PBST. Após as três lavagens, foi adicionado o conjugado IgG anti-bovino Peroxidase (Sigma) diluído a 1:10.000 em PBST e incubado a 37°C por 1 hora. Após a terceira lavagem, as placas foram incubadas a 37°C com o substrato, constituído por 0,2 mg/ml de o-fenilenodiamino (OPD), em solução tampão citrato (pH 5,0) e 0,2 µl/ml de peróxido de hidrogênio 30 volumes. A reação do substrato foi interrompida após 20 minutos, com uma solução de ácido sulfúrico 4N. Os valores de absorvância foram registrados em leitor de ELISA (EIA MICROPLATE READER, Sigma Diagnostics) utilizando filtro de 492 nm. Todos os reagentes foram distribuídos em volumes de 100 µl/well, exceto a solução de ácido sulfúrico 4N, que foi usada em volumes de 32 µl/well. As lavagens (PBST) foram feitas em volumes de 200 µl/well.

Para minimizar a variação entre placas, os valores médios das leituras da absorvância das amostras de soro foram ajustadas usando um fator obtido pela leitura dos controles de cada placa (Passos, 1993):

$$\text{Fator (F)} = \frac{Po - No}{Pt - Nt}$$

Valor de Ajuste=  $F(St-Nt)+No$ , onde:

Po: média dos 4 wells do controle positivo da primeira placa;  
No: média dos 4 wells do controle negativo da primeira placa;  
Pt: média dos 4 wells do controle positivo da placa teste;  
Nt: média dos 4 wells do controle negativo da placa teste;  
St: média dos 2 wells da amostra de soro testada;

### 3.2.3 Validação do teste ELISA

A validação do ELISA foi feita pela comparação através dos resultados da Tabela de Contingência 2x2 (Fletcher & Fletcher, 1989) entre o ELISA e a RIFI na detecção de anticorpos anti-*A. marginale* nas amostras do banco de soros. Os resultados foram agrupados e analisados na forma de ensaios independentes.

### 3.2.4 Banco de Soros

As amostras de soros submetidas ao ELISA e à RIFI pertenciam a quatro categorias: positivos anti-*A. marginale*, campo, negativos para *A. marginale* e inespecíficos.

A categoria positivos era composta por amostras de soro colhidas de bovinos com idade média de 18 meses, importados e submetidos ao processo de premunicação.

A categoria campo era composta por amostras de soro colhidas de bovinos de campo na faixa etária de 18 a 24 meses, naturalmente infectados nos municípios de Igarapé e Esmeraldas no Estado de Minas Gerais.

A categoria negativos era composta por amostras de soro de bovinos na faixa etária de 8 a 12 meses, importados de áreas livres de *A. marginale*, colhidas anteriormente ao processo de premunicação.

A categoria inespecíficos era composta por três amostras de soro de animais experimentalmente inoculados com *B. bigemina* no CNPGC-EMBRAPA de Campo Grande-MS.

O número de soros de cada categoria está especificado na Tabela 1.

TABELA 1: Número de amostras de soro por categoria, testadas no ELISA.

Categoria de soros	Especificação	Nº de amostras
anti- <i>A. marginale</i>	Importados-premunidos	298
Campo (infecção natural)	Igarapé-MG	34
	Esmeraldas-MG	21
Total Campo		55
Negativos	Importados	39
anti- <i>B. bigemina</i> (Inespecíficos)	CNPGC-( infecção experimental)	03
Total geral		395

### 3.3 Reação de Imunofluorescência Indireta-RIFI

#### 3.3.1 Preparação do antígeno

Um volume aproximado de 250 ml de sangue foi colhido do bezerro experimentalmente inoculado, durante a fase ascendente da parasitemia e desfibrinado com pérolas de vidro.



O sangue foi centrifugado a 1.200 x g por 15 minutos e o plasma e a camada de leucócitos desprezados. As hemácias foram lavadas em PBS por três vezes e ressuspensas em dois volumes de PBS, objetivando um hematócrito aproximado de 35%. Deste material foram preparados esfregaços sangüíneos que após serem secos ao ar, foram fixados por 15 minutos em acetona refrigerada, embrulhados em papel alumínio e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso (IICA, 1987).

### 3.3.2 Procedimento da RIFI

No momento do uso, as lâminas contendo antígeno foram descongeladas e impressões circulares foram feitas com esmalte. Diluições quádruplas das amostras de soro a partir de 1:40 foram feitas em PBS, aplicadas sobre os círculos e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS por duas vezes e mais duas vezes com água destilada e após secarem foi aplicado o conjugado fluoresceína-anti-IgG bovino (Sigma), diluído 1:80 em PBS-Tween 20 e incubadas por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após este tempo, as lâminas lavadas em PBS e depois com água destilada por duas vezes e secas foram cobertas com glicerina contendo 10% de PBS e examinadas através do microscópio de imunofluorescência (IICA, 1987). Em cada lâmina de antígeno foram colocados soros controle positivo e negativo e controle PBS. Foram considerados positivos os soros que apresentaram reação de fluorescência nas diluições igual e acima de 1:80.

### 3.4 Análise Estatística

A avaliação dos resultados obtidos foi feita utilizando-se uma Tabela de Contingência 2x2 (Fletcher & Fletcher, 1989).

		Padrão-ouro		
		positivo	negativo	
Teste	positivo	a	b	a+b
	negativo	c	d	c+d
		a+c	b+d	

Sensibilidade	$(S) = \frac{a}{a+c}$
Especificidade	$(E) = \frac{d}{b+d}$
Valor preditivo positivo	$(VPP) = \frac{a}{a+b}$
Valor preditivo negativo	$(VPN) = \frac{d}{c+d}$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

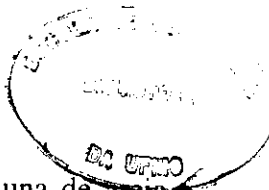
### 4.1 Preparações Antigênicas

A parasitemia de 15% obtida neste trabalho foi abaixo do citado por Barry et al. (1986), Duzgun et al. (1988), Nakamura et al. (1988) e Shkap et al. (1990) como 30%, 80-85%, 29,3% e 30-40% respectivamente. Provavelmente a qualidade das preparações antigênicas obtidas foi prejudicada pela baixa parasitemia conseguida.

As preparações antigênicas obtidas apresentaram diferentes resultados quando submetidas à microscopia eletrônica. A preparação que foi filtrada em coluna de areia e congelada com DMSO 30% em PBS, apresentou maior riqueza em estruturas corpusculares de membranas duplas. Foram vistos também corpúsculos de membranas duplas separados e não revestidos pela membrana externa simples. Estes corpúsculos apresentavam internamente um material granular elétron-denso agrupado em grumos e distribuídos pelo citoplasma. A Figura 2 é uma eletromicrofotografia da preparação filtrada em coluna de areia do mar e congelada com DMSO 30% em PBS após a sonicação e apresenta a matriz elétron-densa e a membrana dupla parcialmente rompida. As estruturas observadas são comparáveis às descritas por Scott et al. (1961), Ristic (1968), Amerault et al. (1975), Kocan et al. (1978), Palmer & McGuire (1984), Patarroyo et al. (1987) e Ribeiro & Lima (1996). Neste trabalho também foi observado a presença de estruturas fragmentadas que, de acordo com Palmer & McGuire (1984), possivelmente são componentes de membrana de



FIGURA 2. Eletromicrofotografia do corpúsculo de *A. marginale*, preparado pela filtração em coluna de areia do mar a partir de hemácias parasitadas congeladas com DMSO 30% em PBS após a sonicação. **A** Nota-se o corpúsculo de *A. marginale* íntegro (seta) e membranas de hemácias (cabeça de seta) (40.000 x). **B** Corpúsculo de *A. marginale* com a membrana dupla parcialmente rompida (seta) (50.000 x). **C** Corpúsculo de *A. marginale* com a matriz elétrondensa (M) e a membrana dupla parcialmente rompida (seta) (125.000 x).



hemácias. Portanto, esta preparação filtrada em coluna de areia e congelada em DMSO foi escolhida, sendo identificada como "DMSO/AREIA".

É interessante salientar que os corpúsculos visualizados nas preparações antigênicas deste trabalho apresentavam alterações estruturais como membranas rompidas, obviamente resultantes da ação física e química causada pelo processamento para obtenção do antígeno (Fig. 2).

Como observado por Scott et al. (1961), Amerault et al. (1975), Palmer & McGuire (1984), Patarroyo et al. (1987) e Ribeiro & Lima (1996), não foram visualizados os prolongamentos citoplasmáticos denominados "apêndices" ou "caudas" observados por Kocan et al. (1978). A presença ou ausência desta estrutura tem sido motivo de divergências entre autores tais como função, influência na virulência da cepa e taxonomia (Patarroyo et al., 1987).

As demais preparações apresentaram à microscopia eletrônica raros corpúsculos de *A. marginale* e uma riqueza em material fragmentado e amorfo que segundo Palmer & McGuire (1984) são possivelmente componentes de membrana de hemácias e material celular (Fig. 3). Nestas preparações que não foram filtradas em coluna de areia a presença de leucócitos provavelmente dificultou a visualização dos corpúsculos de *A. marginale*. Ou então, a lise das preparações antigênicas com a solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 0,9% impossibilitou a identificação dos corpúsculos através da microscopia eletrônica.

Neste trabalho foi usada como antígeno a fração sedimentada após a sonicação. Segundo Ristic (1968), através da centrifugação, dois antígenos distintos podem ser obtidos pela ruptura de eritrócitos infectados por *A. marginale*. Uma fração sedimentada chamada antígeno S que contém o agente causador da anaplasnose. Outra

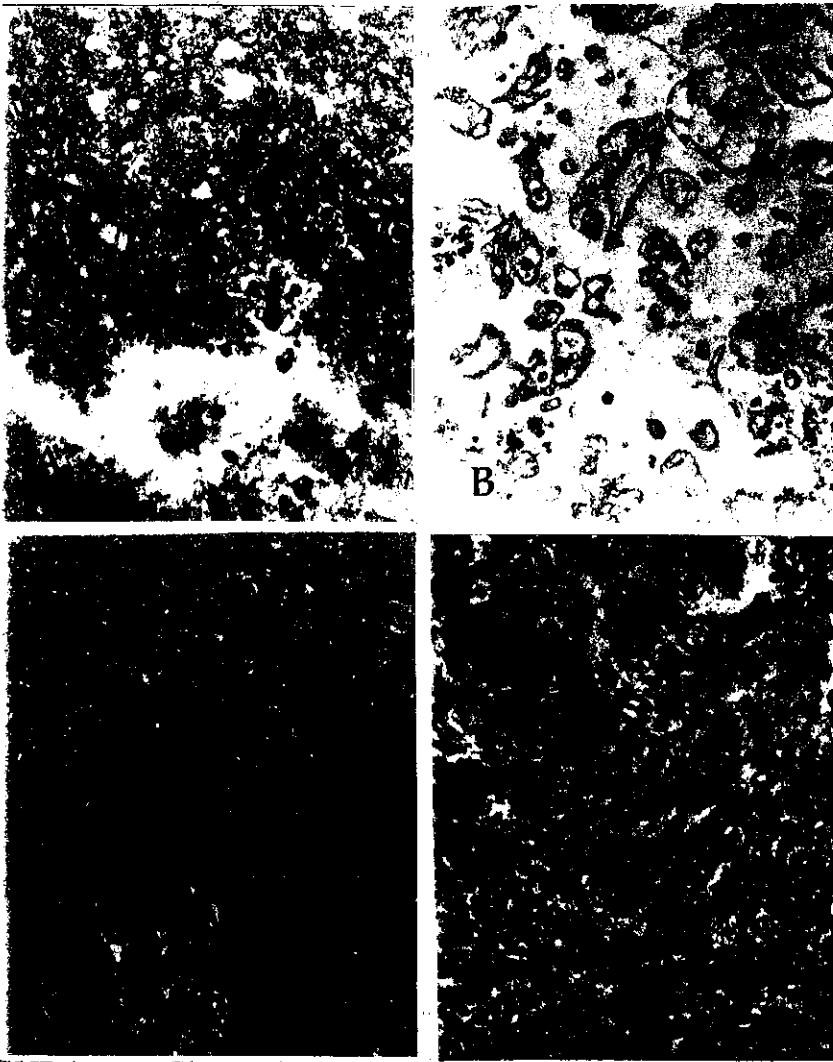


FIGURA 3. Eletromicrofotografia de preparados de hemácias parasitadas por *A. marginale*. Nota-se a ausência de corpúsculos de *A. marginale* íntegros e a presença de material amorfo, provavelmente fragmentos de membrana de hemácias e restos celulares (20.000 x). **A** Sobrenadante da preparação lisada pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . **B** Sobrenadante da preparação congelada com DMSO. **C** Precipitado da preparação lisada pelo  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . **D** Precipitado da preparação congelada com DMSO.

Fração solúvel, chamada antígeno NS composta por uma substância homogênea encontrada ao redor dos corpúsculos iniciais dentro do corpúsculo de inclusão.

#### 4.2 Determinação da diluição ótima do antígeno, soro e conjugado

A determinação das diluições ótimas do antígeno DMSO/AREIA e das amostras de soro foi feita através da titulação do antígeno frente a diluições duplas dos soros controle positivo e negativo. Os valores da absorbância em filtro 492 nm dos soros-controle positivo e negativo nas diferentes diluições são apresentados na Tabela 2. A maior relação positivo/negativo entre os valores de absorbância dos soros-controle positivo e negativo foi obtida quando as amostras de soros foram diluídas 1:100 e o antígeno 1:4000 (Tab. 3). Neste trabalho as amostras de soro foram diluídas a 1:100 e o antígeno DMSO/AREIA a 1:5000 para facilitar a manipulação laboratorial e evitar erros. O conjugado foi usado na diluição de 1:10000 conforme indicação do fabricante (Sigma).

TABELA 2: Valores da absorbância em filtro 492 nm dos soros de bovinos negativo e positivo frente a diluições do antígeno de *Anaplasma marginale* (DMSO/AREIA) para o teste ELISA.

Dil.	Soro	Diluição do Antígeno						
		100	500	1000	2000	4000	8000	16000
100	Neg	,107	,248	,280	,206	,005	,053	,051
	Pos	,237	,986	1,433	1,478	,760	,602	,376
200	Neg	,103	,192	,232	,138	,026	,072	,010
	Pos	,155	,686	1,259	1,362	,642	,521	,273
400	Neg	,120	,170	,185	,120	,037	,021	,015
	Pos	,153	,446	1,177	1,339	,560	,410	,178
800	Neg	,069	,167	,194	,091	,004	,051	,032
	Pos	,070	,369	1,055	1,209	,396	,312	,164

TABELA 3: Relação positivo/negativo dos valores de absorvância de soros de bovinos ao antígeno de *Anaplasma marginale* (DMSO/AREIA) para o teste ELISA.

Soro	Diluição do Antígeno						
	100	500	1000	2000	4000	8000	16000
100	2,22	3,98	5,12	7,18	152,00	11,36	7,37
200	1,51	3,57	5,43	9,87	24,69	7,24	27,30
400	1,28	2,62	6,36	11,16	15,14	19,52	11,86
800	1,02	2,21	5,44	13,29	99,00	6,12	5,13

#### 4.3 Determinação do Valor Discriminante

Para o cálculo do valor discriminante (cut-off) foi utilizada a média da leitura da absorvância de 39 amostras de soro de bovinos importados acrescida de dois desvios-padrão. Este método, usado quando tem-se um número de amostras maior que dez, assume que os valores são distribuídos normalmente e a probabilidade é de 95% dos valores negativos estarem abaixo do valor discriminante.

O valor médio da leitura dos 39 soros negativos foi 0,032 (s.d +/- 0,033), resultando no valor discriminante igual a 0,098.

#### 4.4 Validação do teste ELISA

No primeiro ensaio, foram utilizadas 39 amostras de soro-controle negativas provenientes de bovinos importados e 298 amostras positivas de bovinos importados e submetidos ao processo de premunicação (Tab. 4). Ao ELISA, 37 das amostras negativas tiveram resultado negativo. À RIFI, 28 das amostras negativas mostraram resultado negativo. Em ambos os testes todas as amostras positivas foram positivas. Portanto, pela Tabela de Contingência 2x2, os dois testes apresentaram 100% de sensibilidade. O ELISA apresentou 94,87% de especificidade contra 71,79% da RIFI. No ELISA as duas amostras negativas que foram identificadas como positivas tiveram leituras iguais a 0,110 e 0,102, próximas ao cut off de



0,098. O ELISA apresentou 0,67% de resultados falso-positivos contra 3,56% da RIFI. Os dois testes não apresentaram resultados falso-negativos. O valor preditivo positivo foi de 99,33% e 96,44% respectivamente para ELISA e RIFI. O valor preditivo negativo foi 100% para os dois testes.

TABELA 4: Comparação através dos resultados da Tabela de Contingência 2x2 entre o ELISA e a RIFI na detecção de anticorpos anti-*A. marginale* com 39 soros de bovinos importados e 298 soros de bovinos importados e submetidos ao processo de premunicação.

Perfil das amostras	39 Importados 298 Importados e Premunidos	
	ELISA	RIFI
Sensibilidade	100%	100%
Especificidade	94,87%	71,79%
Falso positivo	0,67%	3,56%
Falso negativo	0	0
Valor Preditivo positivo	99,33%	96,44%
Valor Preditivo negativo	100%	100%

O conhecimento da qualidade ou confiabilidade é importante para a escolha de um determinado teste diagnóstico. O conceito de qualidade de um teste é entendido através de alguns parâmetros como sensibilidade, especificidade e valor de predição (Fletcher & Fletcher 1989).

A sensibilidade foi definida como a proporção das amostras de soro sabidamente positivas detectadas como positivas. E a especificidade como a proporção das amostras sabidamente negativas detectadas como negativas. O Valor Preditivo Positivo (VPP) representa a probabilidade de um resultado positivo ser realmente positivo e o Valor Preditivo Negativo (VPN) a probabilidade de um resultado negativo ser realmente negativo.

Os parâmetros sensibilidade e especificidade apesar de representarem a qualidade de um teste diagnóstico, não podem ser tomados como única base de decisão porque são determinados a partir de situações onde se tem certeza do diagnóstico, refletindo a capacidade de acerto do teste. Na prática é necessário conhecer a eficiência do teste em prever corretamente a verdadeira situação do evento pesquisado. Para isso calcula-se os valores preditivos do teste-alvo. O valor preditivo é conhecido como pós-teste uma vez que é a probabilidade de acerto do resultado do teste em questão e depende da prevalência da doença na população. A prevalência, número de casos do evento que ocorre na população num dado momento, é considerada como o pré-teste. Resultados considerados positivos, mesmo de um teste muito específico, quando aplicado em situações de baixa prevalência, serão em grande parte falso-positivos. Da mesma forma resultados considerados negativos, mesmo de um teste muito sensível, quando aplicado em situações de alta prevalência, provavelmente serão falso-negativos (Fletcher & Fletcher, 1989). Neste conceito, em situações de baixa prevalência é preferível o teste mais específico, que possua elevado Valor Preditivo Positivo e menor porcentagem de resultados falso-positivos.

Neste primeiro ensaio é importante ressaltar a segurança quanto a positividade e negatividade das amostras. Esta segurança fundamenta-se na origem das amostras. Os soros negativos foram colhidos de animais importados de áreas livres, no momento da chegada ao Brasil ou seja, garantidamente negativos. Os soros positivos foram colhidos de animais também importados, após o processo de premunicação, quando houve inoculação experimental dos hemoparasitas, diagnóstico clínico e laboratorial da doença e tratamento, com subsequente restabelecimento dos animais. Segundo Fletcher & Fletcher (1989) a dificuldade para avaliação segura de um teste está em definir um padrão verdadeiro. Neste ensaio há o "padrão-ouro", o que dá maior credibilidade aos resultados.

A prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* em Minas Gerais é elevada, mas a presença da anaplasmose também é uma realidade, indicando ser uma área endêmica instável (Ribeiro & Reis, 1981; Ribeiro et al., 1983; Ribeiro et al., 1984). Entende-se que a prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* que represente proteção é baixa ou torna-se ausente em determinadas situações. O teste ELISA foi mais específico e teve um VPP maior que a RIFI. Isto quer dizer que um resultado positivo dado pelo ELISA terá menor probabilidade de ser um resultado falso-positivo.

Em condições enzoóticas é imprescindível a identificação dos animais soro-negativos. Daí, serem necessários testes específicos ou seja, com menor porcentagem de resultados falso-positivos. Nestas áreas, os resultados falso-positivos representam os animais negativos. Portanto, são os animais que poderão sofrer a doença. Segundo Duzgun et al. (1988), testes de alta especificidade serviriam para verificar se problemas como o diagnóstico incorreto de soros de animais podem ser superados. No caso de importação de animais de áreas livres ou de áreas com instabilidade enzoótica a identificação dos soro-negativos é importante uma vez que estes animais serão introduzidos em situações enzoóticas, onde a exposição de suscetíveis é de grande risco.

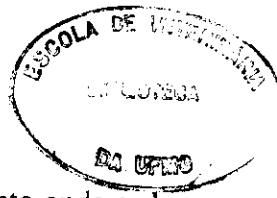
No segundo ensaio, ELISA e RIFI foram comparados através das 55 amostras de soro de animais de campo (Tab. 5).

TABELA 5: Comparação através da Tabela de Contingência 2x2 entre o ELISA e a RIFI na detecção de anticorpos anti-*A. marginale* com 55 soros de bovinos de campo.

Perfil das amostras	Campo 55 amostras	
	ELISA (alvo)	RIFI (alvo)
Sensibilidade	70,37%	100%
Especificidade	100%	5,88%
Falso positivo	0	29,63%
Falso negativo	94,12%	0
Valor Preditivo positivo	100%	70,37%
Valor Preditivo negativo	5,88%	100%

Nesta comparação com as amostras de campo, quando o ELISA foi o teste-alvo e a RIFI o padrão, o ELISA apresentou 94,12% de resultados falso-negativo embora este mesmo ELISA tenha apresentado alta especificidade nos ensaios sorológicos (Tabs. 4 e 5). Segundo Fletcher & Fletcher (1989) se um novo teste é comparado com um teste-padrão não exato, esse novo teste pode parecer pior, mesmo que seja realmente melhor. Se o novo teste é mais específico, os seus resultados serão considerados como falso-negativo quando comparado com o teste antigo e parecerá inferior mesmo quando estiver mais próximo da verdade.

Um estudo realizado por Ribeiro et al. (1984) determinando a prevalência de anticorpos anti-*A. marginale* em uma importante região pecuária do Estado de Minas Gerais revelou que 18,9% dos animais estavam sujeitos a anaplasrose. Um inquérito de opinião entre criadores realizado por Ribeiro et al. (1983) nesta mesma região mostrou a falta de conhecimento da doença por parte dos criadores, embora as plasmoses estivessem entre as principais doenças dos bezerros. Diante destes resultados a segurança quanto a positividade/negatividade das amostras de soro colhidas de animais de campo é ausente, não há um padrão-ouro. Assim para a



comparação entre o ELISA e a RIFI foi feito o confronto onde **cada** teste foi adotado ora como teste-alvo, ora como teste-padrão para análise na Tabela de Contingência 2x2. Esta comparação foi apresentada na Tabela 5.

Três amostras de soros bovino anti-*B. bigemina* provenientes do CNBGC-EMBRAPA foram testadas para verificar a existência de reação cruzada. As três amostras anti-*B. bigemina* apresentaram resultado negativo ao ELISA para *A. marginale*.

## 5 CONCLUSÕES

- A filtração da preparação antigênica através da coluna de areia do mar para remoção dos leucócitos melhora a qualidade do antígeno de *Anaplasma marginale* para o teste ELISA.
- A Microscopia Eletrônica é um parâmetro útil para avaliação da qualidade do antígeno de *A. marginale* para o ELISA.
- O teste ELISA desenvolvido apresentou especificidade maior que a RIFI.
- O ELISA desenvolvido é adequado para detecção de anticorpos anti-*A. marginale* em soros de bovinos submetidos ao processo de premunicação podendo ser útil para uso em estudos epidemiológicos da anaplasnose.

### SUMMARY

An ELISA test using crude antigen was developed for detecting antibodies against *A. marginale* in bovine sera. The antigen was produced by inoculation of a splenectomized calf with approximately  $5 \times 10^8$  parasited erythrocytes stored in liquid nitrogen. During the peak of parasitaemia, blood was collected and after centrifugation the plasma and buffy coat were discarded. In half of the pellet the leukocytes were removed by filtration through a column containing sea sand. One part of the material was stored at  $-70^\circ\text{C}$  with DMSO 30% within Phosphate Buffer Saline (PBS) and another was lysed with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,9% and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The other half of the pellet was divided into two parts. One part was stored at  $-70^\circ\text{C}$  with DMSO 30% within PBS and another was lysed with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,9% and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Later all preparations were disrupted by sonication and the sediments were solubilized with Triton X-100. After each procedure, electron micrograph of the antigenic preparations were carried out. Typical *Anaplasma* structures were seen only in the antigenic preparation from which the leukocytes had been removed and the erythrocytes had been stored with DMSO 30%. Optimal dilutions of the antigen, positive and negative reference sera were determined by chequerboard titrations and the cut off value was determined by the mean reading of 39 negative reference sera increased by two standard-deviations. The ELISA system showed higher specificity (94,87%) than the IFAT (71,79%).

Key-words: ELISA, *Anaplasma marginale*, cattle, premunition.

## APÊNDICE

### Soluções para ELISA

#### Solução do Substrato OPD (Orto-fenilenodiamino)

O substrato era preparado momentos antes do uso em frasco escuro ou coberto com papel alumínio. Eram preparados 10 ml de solução por placa na seguinte composição:

- Em 10 ml de solução tampão de ácido cítrico (pH 5,0), eram adicionados 2,0 mg do substrato e 2,0 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30 volumes.

#### Solução tampão

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> \_\_\_\_\_ 1,59 g.  
NaHCO<sub>3</sub> \_\_\_\_\_ 2,93 g.  
H<sub>2</sub>O ddq.s.p. \_\_\_\_\_ 1.000 ml

#### Solução tampão de ácido cítrico para o substrato (pH 5,0)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 7,19 g.  
Àc. Cítrico \_\_\_\_\_ 5,19 g.  
H<sub>2</sub>O dd q.s.p. \_\_\_\_\_ 1.000 ml

#### Ácido Sulfúrico 4 N

#### Solução PBS Tween 20 (PBST)

Tween 20 \_\_\_\_\_ 500 µl  
PBS (pH 7,6) \_\_\_\_\_ 1.000 ml





## PBS

NaCl \_\_\_\_\_ 8 g.

KCl \_\_\_\_\_ 0,2 g.

NaHPO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 1,44 g.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 2,4 g.

H<sub>2</sub> O d.d. \_\_\_\_\_ 800 ml

o pH era ajustado para 7,2 e o volume completado para 1.000 ml.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, M., ARRELANO-SOTA, C., CERESER, V.H., et al. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Latin America and the Caribbean. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, v.11, n.3, p.713-733, 1992.
- AMERAULT, T.E., ROBY, T.O., SEALOCK, R.L. Ultrastructure of *Anaplasma marginale* after freeze-fracture. **Am. J. Vet. Res.** v.36, n.10, p.1515-1519, 1975.
- BARRY, D.N., PARKER, R.J., DE VOS, A.J., et al. A microplate enzyme-linked immunosorbent assay for measuring antibody to *Anaplasma marginale* in cattle serum. **Aust. Vet. J.**, v.63, n.3, p.76-79, 1986.
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. Willians & Wilkins, v.1, 1984.
- BIDWELL, D.E., TURP, P., JOYNER, L.P., et al. Comparisions of serological tests for babesia in British cattle. **Vet. Rec.**, v.103, n.11, p.446-449, 1978.
- DUZGUN, A., SCHUNTNER, C.A., WRIGHT, I.G., et al. A sensitive ELISA technique for the diagnosis of *Anaplasma marginale* Infections. **Vet. Parasitol.**, v.29, n.1, p.1/7, 1988.

- FIGUEROA, J.V., CHIEVES, L.P., JOHSON, G.S., et al. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Vet. Parasitol.**, v.50, n.1/2, p.69-81, 1993.
- FLETCHER, R.H., & FLETCHER, S.W. **Epidemiologia Clínica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989. 312p.
- GOFF, W.L., JONHSON, W.C., KUTTLER, K.L. Development of an indirect fluorescent antibody test, using microfluorometry as a diagnostic test for bovine anaplasmosis. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.5, p.1080-1084, 1985.
- GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. Porto Alegre: Edição do Autor, 1993. 80p.
- GUGLIELMONE, A.A. Epidemiology of Babesiosis and Anaplasmosis in South and Central America. **Vet. Parasitol.**, v.57, n.3, p.109-119, 1995.
- IICA. **TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE BABESIOSIS Y ANAPLASMOSIS BOVINAS**. San José: Costa Rica, 1988. 79p.
- KOCAN, K.M., VENABLE, J.H., BROCK, W.E. Ultrastructure of anaplasma inclusions (Pawhuska isolate) and their appendages in intact and hemolyzed erythrocytes and in Complement-Fixation antigenic. **Am. J. Vet. Res.**, v.39, n.7, p.1123-1129, 1978.

- KROON, J.F.E.M., PERIÉ, N.M., FRANSSEN, F.F.S., et al. The indirect fluorescent antibody test for bovine anaplasmosis. **Vet. Q.**, v.12, n.2, p.124-128, 1990.
- LÖSS, A.C.S., LIMA, J.D., BRAZ Jr., C.J. et al. Avaliação do curso da infecção e da resposta humoral para anaplasmosose em bovinos submetidos ao processo de premunicação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.44, n.5, p.397-406, 1992.
- MADRUGA, C.R., AYCARDI, E., KESSLER, R., et al. Níveis de anticorpos anti-*Babesia bigemina* e *Babesia bovis* em bezerros da raça Nelore, Ibage e cruzamentos de Nelore. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.19, n.9, p.1163-1168, 1984.
- MONTENEGRO-JAMES, S., GUILLEN, A.T., MA, J.A., et al. Use of the dot enzyme-linked immunosorbent assay with isolated *Anaplasma marginale* initial bodies for serodiagnosis of anaplasmosis in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, n.10, p.1518-1521, 1990.
- MONTENEGRO-JAMES, S., JAMES, M.A, RISTIC, M. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.11, p.2401-2403, 1985.
- MURPHY, F.A., OSEBOLD, J.W., AALUND, O. Kinetics of the antibody response to *Anaplasma marginale* infection. **J. Infect. Dis.**, v.116, n.1, p.99-111, 1966.

- NAKAMURA, Y., SHIMIZU, S., MINAMI, T., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using solubilised antigen for detection of antibodies to *Anaplasma marginale*. **Trop. Anim. Health Prod.**, v.20, n.4, p.259-266, 1988.
- PALMER, G.H. Development of diagnostic reagents for anaplasmosis and babesiosis. In: **RECENT DEVELOPMENT IN THE CONTROL OF ANAPLASMOSIS, BABESIOSIS AND COWDRIOSIS**. Proceedings of a Workshop held at Ilrad. Nairobi, Kenya., 1991, p.59-66.
- PALMER, G.H. & McGUIRE, T.C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. **J. Immunol.**, v.133, n.2, p.1010-1015, 1984.
- PASSOS, L.M.F. **Immunological studies on bovine babesiosis with particular reference to Brazil, using *in vitro* culture-derived antigens**. Edinburgh: University of Edinburgh, 1993. 326p. Tese (Ph.D).
- PASSOS, L.M.F. & LIMA, J.D. Diagnóstico de anaplasmosose em Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.36, n.6, p.743, 1984.
- PASSOS, L.M.F., MONTEIRO, A.M.F., FERNANDES, A.A. Padronização do uso de areia do mar na remoção de leucócitos de sangue bovino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.47, n.6, p.855-858, 1995.

- PATARROYO, J.H.S., HENCKEL, D.J., PRATES, A.A. et al.  
Antigenic profile of a pure isolate of *Anaplasma marginale* of Brazilian origin, using a Western blot technique. **Vet. Parasitol.**, v.52, n.1-2, p.129-137, 1994.
- PATARROYO, J.H.S., RIBEIRO, M.F.B., VARGAS, M.I.V., et al.  
*Anaplasma marginale*: ultraestrutura de uma amostra de origem brasileira. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.39, n.6, p.839-847, 1987.
- RIBEIRO, M.F.B. **Estudo ao microscópio óptico e eletrônico da morfologia e evolução do *Anaplasma marginale* em teleóginas de *Boophilus microplus***. Belo Horizonte: UFMG, 1991. 133p. Tese (Doutorado).
- RIBEIRO, M.F.B. & LIMA, J.D. Morphology and development of *Anaplasma marginale* in midgut of engorged female ticks of *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.**, v.61, n.3, p.31-39, 1996.
- RIBEIRO, M.F.B. & REIS, R. Exposição natural de bezerros em área endêmica de *Anaplasma marginale* no Estado de Minas Gerais. **Arq. Esc. Vet. UFMG**, v.33, n.1, p.63-66, 1981.
- RIBEIRO, M.F.B., LIMA, J.D., GUIMARÃES, A.M., et al.  
Transmissão congênita da anaplasmosse bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.47, n.3, p.297-304, 1995.
- RIBEIRO, M.F.B., PATARROYO, J.H.S., SANTOS, J.L. et al.  
Inquérito de opinião com criadores da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. I- Alguns fatores associados com mortalidade de bezerros. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.35, n.4, p.547-556, 1983.

- RIBEIRO, M.F.B., PATARROYO, J.H.S., SANTOS, J.L. et al. Epidemiologia da Anaplasmosse Bovina no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de Anticorpos Aglutinantes e Fluorescentes na Zona da Mata. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.36, n.4, p.425-432, 1984.
- RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WEINMAN, D., RISTIC, M. **Infectious Blood Diseases of Man and Animals**. New York. Academic Press, 1968, p.473-536.
- ROBLES, M.T., MARTINEZ, J.A.A., ARMEON, J.A.R., et al. La prueba de ELISA en el diagnostico de la anaplasmosis. **Téc. Pec. Méx.**, v.52, p.45-50, 1986.
- SCHUNTNER, C.A. & LEATCH, G. Radioimmunoassay for *Anaplasma marginale* antibodies in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.49, n.4, p.504-507, 1988.
- SCOTT, W.L., GEER, J.C., FOOTE, L.E. Electron Microscopy of *Anaplasma marginale* in the bovine erythrocytes. **Am. J. Vet. Res.**, v.22, n.90, p.877-881, 1961.
- SHKAP, V., BIN, H., UNGAR-WARON, H., et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anaplasma centrale* and *A. marginale*. **Vet. Microbiol.**, v.25, n.1, p.45-53, 1990.
- SU, J-F. & HSU, F.S. Serological assay and seroprevalence of ruminant *Anaplasma marginale* infection in Taiwan. **J. Chin. Soc. Vet. Sci.**, v.19, n.2, p.79-89, 1993.
- SUMMERS, W.A., PADGETT, F. Electron microscopy of negatively stained *Anaplasma marginale* Theiler 1910. **Am. J. Vet. Res.**, v.31, n.9, p.1679-1686, 1970.

- THOEN, C.O., BLACKBURN, B., MILLS, K., et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detecting antibodies in cattle in a herd in which anaplasmosis was diagnosed. **J. Clin. Microbiol.**, v.11, n.5, p.499-502, 1980.
- TRUEBLOOD, E.S., McGUIRE, T.C., PALMER, G.H. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, n.7, p.1542-1544, 1991.
- VENKATESAN, P. & WAKELIN, D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. **Parasitol. Today**, v.9, n.6, p.228-232, 1993.
- VOLLER, A. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.70, n.2, p.98-106, 1976.
- WANDURAGALA, L. & RISTIC, M. Anaplasmosis. In: WOLDEHIWET, Z., RISTIC, M. **Rickettsial and Chlamydial Diseases of Domestic Animals**. Oxford: Pergamon Press, 1993, p.65-83.
- WILSON, A.J., TRUEMAN, K.F., SPINKS, G., et al. A comparison of 4 serological tests in the detection of humoral antibodies to anaplasmosis in cattle. **Aust. Vet. J.**, v.54, n.8, p.383-386, 1978.
- WINKLER, G.C., BROWN, G.M., LUTZ, H. Detection of antibodies to *Anaplasma marginale* by an improved Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Sodium Dodecyl Sulfate-disrupted antigen. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, n.4, p.633-636, 1987.





WRIGHT, I.G. Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp and *Anaplasma* sp in domestic animals. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, v.9, n.2, p.345-356, 1990.

WRIGHT, P.F., NILSON, E., VAN ROOIJ, E.M.A., et al. Standardisation and validation of Enzyme-linked Immunosorbent Assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.**, v.12, n.22, p.35-450, 1993.

UFMG - ESCOLA DE VETERINARIA - BIBLIOTECA  
Doação de 101 Livro Pós-Grad.  
EV UFMG Preço \_\_\_\_\_  
Data 15.02.97