

ESTUDO SOROLÓGICO DE INFECÇÕES EXPERIMENTAIS POR *Trypanosoma evansi*, EM COBAIAS

Teresa Cristina Goulart de OLIVEIRA (1), Roberto SOGAYAR (2) & Ednir SALATA (2)

RESUMO

Comparamos os métodos de Imunofluorescência Indireta (IFI), Imunodifusão Radial Dupla e Aglutinação, para a pesquisa de anticorpos em soros, na tripanossomiase experimental por *Trypanosoma evansi*, em cobaias. Foram obtidas 20 amostras de soro correspondentes às 4 primeiras semanas de infecção. A IFI foi positiva em apenas 6 animais, com títulos variando de 1:4 a 1:16. Os títulos mais altos foram observados na 3ª semana pós-infecção. Anticorpos aglutinantes foram observados a partir da 1ª semana pós-infecção e, após a 2ª semana, todos os animais apresentaram reação de aglutinação positiva, com títulos variando de 1:8.000 a 1:250.000. O tratamento dos soros com 2-Mercapto-etanol inibiu a reação de aglutinação, sugerindo ser IgM a principal classe dos anticorpos presentes no soro dos animais infectados. Não se constatou a presença de anticorpos precipitantes durante todo o curso da infecção.

UNITERMOS: *Trypanosoma evansi*; Sorologia; Infecção experimental.

INTRODUÇÃO

Infecções por *Trypanosoma evansi* são prevalentes em vários países da Ásia, Norte da África e América Latina. O diagnóstico da enfermidade é relativamente simples em animais com infecções agudas, quando os parasitas estão presentes em grande número no sangue periférico. Entretanto, torna-se mais difícil nas infecções crônicas quando as parasitemias são baixas e intermitentes. A forma crônica é mais frequentemente observada em bovinos e búfalos que atuam como reservatórios do parasita (LOSOS, 1980⁸).

Conseqüentemente, vários métodos foram estudados afim de demonstrar as reações antígeno-anticorpo nas tripanossomíases por *T. evansi*, sendo os principais os métodos de Hemaglu-

tinação Indireta (GILL, 1964⁴), Difusão em Gel, Fixação de Complemento (GILL, 1965⁵), Aglutinação (JATKAR, 1977⁶), ELISA (LUCKINS et alii, 1978⁹) e Imunofluorescência Indireta (LUCKINS et alii, 1979¹⁰).

No presente trabalho comparamos os métodos de Imunofluorescência Indireta (IFI), Imunodifusão Radial Dupla e Aglutinação Direta no diagnóstico de infecções experimentais de cobaias com *T. evansi*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas 30 cobaias machos com 2 meses de idade, inoculadas por via intraperito-

(1) Prof. Assistente — Deptº de Parasitologia — IB/UNESP, Campus de Botucatu. CEP 13610 Botucatu, SP, Brasil.

(2) Prof. Assistente Doutor — Deptº de Parasitologia — IB/UNESP, Campus de Botucatu. Botucatu, SP, Brasil.

neal com 5×10^4 tripanossomas. A amostra de *T. evansi* foi fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Obtenção de Soro Imune

Após a inoculação, semanalmente sorteava-se 5 cobaias que eram sangradas por punção cardíaca para obtenção de soro. Desta forma obteve-se um total de 20 soros, correspondentes às 4 primeiras semanas de infecção. As 10 cobaias restantes morreram no decorrer deste período não possibilitando sua utilização. Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos e estocados a -20°C até o momento do uso.

Teste de Imunofluorescência Indireta (IFI)

Conjugado Fluorescente: utilizou-se conjugado fluorescente anti-imunoglobulina (anti-Ig) total de cobaia, produzido em coelho e diluído em PBS e azul de Evans a 0,001%. O conjugado apresentou título de 1:20, diluição na qual foi empregado.

Preparo de Lâminas de Antígeno: tripanossomas obtidos de ratos infectados foram lavados em PBS e fixados em formalina a 2% em salina. Após 30 minutos os tripanossomas foram lavados por 2 vezes em PBS e distribuídos em lâminas na concentração de 10 a 20 parasitas por campo microscópico (400 aumentos).

Reação de Imunofluorescência: os soros foram incubados sobre o material antigênico a 37°C por 45 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes por imersão em PBS durante 10 minutos.

Após nova incubação em presença de conjugado fluorescente, as lâminas foram novamente lavadas por imersão e montadas sob lamínula com auxílio de glicerina tamponada com solução carbonato-bicarbonato (pH = 8,5).

A leitura foi realizada com objetiva 40X, de imersão, em Microscópio ZEISS munido de lâmpada HBO 200 e condensador de campo escuro.

Teste de Imunodifusão Radial Dupla

Utilizou-se a técnica de difusão em gel de ágar, em placas, segundo OUCHTERLONY

(1956¹²). Os antígenos foram obtidos através de separação dos tripanossomas oriundos de ratos infectados, por passagem em coluna de Dietilaminoetil Celulose (DEAE-celulose) e ulterior ruptura por sonicação. Desta forma foram obtidos antígenos solúveis de *T. evansi*, nas concentrações de 0,2; 1,0; 5,0; 10 e 15 mg de proteína/ml. Além destes, empregou-se soro de ratos com 3 dias de infecção, como possível fonte de antígenos (BOEHRINGER, 1965²). As reações foram feitas com soro não diluído e diluído em solução salina até 1:128 empregando-se razão 2. As placas foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida e as leituras foram feitas após 24, 48 e 72 horas.

Além dos soros de cobaias, foram feitas reações com soro de coelho hiperimune, por nós produzido.

Teste de Aglutinação

Para a reação de aglutinação usou-se como antígeno formas vivas de *T. evansi*, provenientes de ratos infectados, e separados por centrifugação a 100g/5min. A suspensão de tripanossomas era diluída em PBS glicosado a 2% de forma a se obter uma concentração de 3×10^6 tripanossomas/ml. Para a reação, realizada em lâminas, utilizou-se 25 μ l desta suspensão e 25 μ l de soro, puro ou diluído. Após 1 hora de incubação a 28°C em câmara úmida, procedia-se à leitura em microscópio, empregando objetiva 40X. Os soros que apresentaram títulos aglutinantes foram tratados com solução de 2-mercapto-etanol a 0,2M (CAMARGO et alii, 1986³), afim de se verificar a classe de imunoglobulina envolvida nesta reação.

RESULTADOS

Imunofluorescência Indireta

Dos 20 soros de cobaias examinados, apenas 6 apresentaram reação de IFI positiva, com títulos bastante baixos, variando de 1:4 a 1:16. Os anticorpos foram primeiramente detectados aos 15 dias pós-infecção e os títulos mais altos (1:16) apareceram nos soros de animais com 3 semanas de infecção.

Imunodifusão Radial Dupla

Não se constatou a presença de anticorpos precipitantes no soro de cobaias, durante todo o curso da infecção, tanto no sistema soro de cobaia-antígeno sonicado, como no sistema soro de cobaia-soro de rato infectado. Para testar a eficiência dos antígenos, a mesma reação foi feita com soro de coelho hiperimunizado contra os dois tipos de antígenos. No sistema soro de coelho hiperimune-antígeno sonicado foi possível observar precipitação, com antígenos nas concentrações protéicas de 10 e 15 mg/ml. Entretanto no segundo sistema (soro de coelho hiperimune-soro de rato infectado) não se observou precipitação.

Aglutinação

Com uma semana de infecção já foi possível detectar anticorpos aglutinantes no soro de uma cobaia. A partir de 15 dias, todos os animais apresentaram reação positiva com títulos variando de 1:8.000 a 1:250.000. Nesta reação foi possível observar que os soros só apresentaram aglutinação em diluições acima de 1:16, sendo negativas com soro puro e a 1:4, caracterizando o fenômeno de pró-zona. O tratamento dos soros positivos com solução 2-Mercapto-etanol 0,2M inibiu completamente a reação de aglutinação.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos sorológicos sensíveis é imprescindível para o diagnóstico das tripanossomíases causadas por *T. evansi*, uma vez que muitos animais apresentam infecções sub-patentes.

Infecções experimentais em cobaias simulam a forma crônica da infecção, pois estas, como os hospedeiros naturais (SEN et alii, 1959¹⁴), permanecem infectadas por pelo menos 2 meses antes de morrer (OLIVEIRA et alii¹¹). Além disso a cobaia é um animal que apresenta boa produção de anticorpos, sendo portanto bastante apropriada aos estudos imunológicos com *T. evansi* (GILL, 1965⁵).

A IFI nas infecções por *T. evansi* foi estudada em coelho (GILL, 1965⁵; LUCKINS et alii, 1978⁹) e bovinos (VERMA & GAUTAM, 1977¹⁵),

com bons resultados. Os resultados por nós obtidos com esta técnica não foram satisfatórios, provavelmente pelo fato de haveremos empregado conjugado anti Ig-total de cobaias. Sabendo-se que a resposta imunológica de animais infectados com *T. evansi* se faz principalmente por anticorpos da classe IgM (LUCKINS et alii, 1978⁹), julgamos que o uso de conjugado específico, anti-IgM, deve tornar a técnica mais sensível.

Anticorpos precipitantes não foram detectados no soro de cobaias durante todo o curso da infecção. Entretanto GILL (1965⁵), descreve a presença destes anticorpos no soro de coelhos. Todavia, este autor empregou soro de coelho imunizado, produzido após repetidas inoculações de parasitas fixados, adicionados de adjuvante e de antígenos solúveis de *T. evansi*. Utilizando este mesmo tipo de imunização foi-nos possível também detectar anticorpos precipitantes no soro de coelhos.

VERMA & GAUTAM (1977¹⁵), mencionam que a imunodifusão em gel apresenta resultados irregulares, com alta frequência de falsos negativos. A análise destes fatos sugere-nos que a natureza dos anticorpos seja um dos fatores que deve interferir de forma decisiva no sucesso da reação de imunodifusão em gel. Desta forma, devemos considerar as classes de imunoglobulina que poderiam estar envolvidas na reação. IgM é a principal imunoglobulina presente no soro de animais infectados com *T. evansi* e segundo KLEIN et alii (1967⁷), a IgM 19S difunde-se pouco em gel. Desta forma, como no soro há predominância de IgM 19S esta poderia ser uma das causas pelas quais não se observa em certos casos a precipitação. Por outro lado, os títulos de IgG caem a níveis indetectáveis após as crises tripanolíticas, provavelmente por formarem imunocomplexos, e posteriormente retornam aos títulos originais (RAADT, 1966¹³). Por conseguinte, nas formas crônicas da infecção, quando os parasitas são escassos no sangue por prolongados períodos, ou nas imunizações, estes anticorpos (IgG) poderiam ser responsáveis pelas reações positivas nessas ocasiões.

Com relação aos antígenos, BOEHRINGER (1965²), relata resultados positivos com a técnica de imunodifusão em gel utilizando como antígeno o soro de ratos com 3 dias de infecção con-

tra o soro de cavalos. Utilizando esta mesma fonte de antígeno, não obtivemos precipitação contra soro de cobaia, bem como contra soro de coelho hiperimunizado. Apesar do referido autor não comentar sobre a natureza do antígeno proposto, parece-nos ter ele partido da premissa de que antígenos solúveis estariam presentes no soro de ratos com 3 dias de infecção. Entretanto, ALLSOP et alii (1971¹) mostraram evidências de que antígenos solúveis de tripanossomas do subgrupo *brucei*, não se apresentam "in vivo", ocorrendo somente "in vitro" por desintegração dos parasitas. Como não nos foi possível encontrar na literatura outra referência sobre o emprego de soro de animal infectado como fonte de antígeno para o diagnóstico desta tripanossomíase, julgamos que maiores estudos devem ser feitos para que se possa concluir a questão.

A reação de aglutinação foi a técnica mais sensível no diagnóstico da infecção por *T. evansi* em cobaias, pois os resultados apareceram precocemente e os títulos foram bastante altos. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por GILL (1965⁵), confirmando ser a aglutinação uma reação bastante sensível.

O tratamento dos soros com 2-Mercapto-etanol, inibiu completamente a reação de aglutinação, sugerindo, portanto, ser IgM a principal classe de imunoglobulina presente no soro de cobaias infectadas com *T. evansi*. Segundo LUCKINS et alii (1978⁹) os níveis de IgM aumentam de 5 a 20 vezes em relação aos níveis normais, nos animais infectados com *T. evansi*.

SUMMARY

Studies on the serological diagnosis of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in guinea-pigs.

Sera of 20 guinea-pigs experimentally infected with *Trypanosoma evansi* were obtained in order to compare the efficacy of gel diffusion, indirect immunofluorescence and agglutination tests, to detect antibodies to *T. evansi*. The fluorescent antibody test was positive in six (6) animals and the antibody titres were very low (1:4 to 1:16). The agglutination test detected trypanosomal antibodies in sera one (1) week after infection. After two (2) weeks all animals were

positive with high titres (1:8.000 to 1:250.000). Agglutination was inhibited when sera were treated with 2-Mercapto-etanol. This fact suggests that IgM is the principal class of antibodies in sera of infected guinea-pigs. Precipitating antibodies were not detected during the course of infection.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLSOPP, B. A.; MJOGU, A. R. & HUMPHRYES, K. C. — Nature and location of *Trypanosoma brucei* sub-group exoantigen and its relationship to 4S antigen. *Exp. Parasit.*, 29: 271-284, 1971.
2. BOEHRINGER, E. G. — La doble difusión en agar en el diagnóstico del "Mal de Caderas" (*T. equinum*). *Rev. Med. vet. (B. Aires)*, 46: 425-431, 1965.
3. CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ROCCA, A. & BELLEM, Z. R. — Um teste prático para a sorologia da toxoplasmose: o teste de hemaglutinação. Estudo comparativo com os testes de imunofluorescência e imunoenzimático de captura de IgM. *Rev. bras. Pat. clin.*, 22: 196-201, 1986.
4. GILL, B. S. — A procedure for the indirect haemagglutination test for the study of experimentally *Trypanosoma evansi* infections. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 58: 473-480, 1964.
5. GILL, B. S. — Studies on the serological diagnosis of *Trypanosoma evansi*. *J. comp. Path.*, 75: 175-183, 1965.
6. JATKAR, P. R.; RAO, P. V. & SINGH, M. — Diagnosis of Surra: capillary agglutination test. *Indian vet. J.*, 54: 795-797, 1977.
7. KLEIN, F.; MATTERN, P.; RADEMA, H. & VANZEWI, T. L. — Slowly sedimenting serum components reacting with anti-IgM sera. *Immunology*, 13: 641-647, 1967.
8. LOSOS, G. J. — Diseases caused by *Trypanosoma evansi*. A review. *Vet. Res. Comm.*, 4: 165-181, 1980.
9. LUCKINS, A. G.; GRAY, A. R. & RAE, P. — Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with *Trypanosoma evansi* in rabbits. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 72: 429-441, 1978.
10. LUCKINS, A. G.; BOID, R.; RAE, P.; MAHMOUD, M. M.; EL MAZIK, K. H. & GRAY, A. R. — Serodiagnosis of infection with *Trypanosoma evansi* in camels in the Sudan. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 11: 1-12, 1979.
11. OLIVEIRA, T. C. G.; MENEQUIN, J. M. & PEREIRA, E. A. — Comportamento do *Trypanosoma evansi* (= *T. equinum*) em animais de laboratório. *Arq. bras. Med. vet. Zoot.*, (No prelo).

12. OUCHTERLONY, O. — Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. **Progr. Allergy**, 5: 1, 1958.
13. RAADT, P. de — Immunity and antigenic variation: clinical observations suggestive of immune phenomena in African trypanosomiasis. In: **TRYPANOSOMIASIS AND LEISHMANIASIS WITH SPECIAL REFERENCE TO CHAGAS' DISEASE**. Amsterdam, Elsevier, 1974. p. 199-216. (Ciba Foundation Symposium 20, new series).
14. SEN, H. G.; DUTTA, B. N. & RAY, H. N. — Biochemical changes in experimentally induced *Trypanosoma evansi* infection in rabbits and guinea-pigs. **Indian J. vet. Sci.**, 29: 118-123, 1959.
15. VERMA, B. B. & GAUTAM, O. P. — Serological diagnosis of experimental bovine surra (*Trypanosoma evansi*) infection. A comparison of passive haemagglutination, gel diffusion and indirect fluorescent antibody tests. **Indian vet. J.**, 59: 809-813, 1977.

Recebido para publicação em 4/7/1988