



Congrega
Urcamp 2016

13ª Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa

REVISTA DA JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA ISSN:1982-2960

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOADSORVENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgG total, IgG1 e IgG2 CONTRA ANTÍGENOS DE LARVAS, INTESTINO E GLÂNDULAS SALIVARES DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

STANDARDIZATION OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) FOR DETECTION OF TOTAL IgG, IgG1 E IgG2 AGAINST ANTIGENS OF LARVAE, INTESTINE AND SALIVARY GLANDS OF *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO IMUNOADSORVENTE LIGADO A ENZIMA (ELISA) PARA DETECÇÃO DE IgG total, IgG1 e IgG2 CONTRA ANTÍGENOS DE LARVAS, INTESTINO E GLÂNDULAS SALIVARES DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

RESUMO

I – Introdução e justificativa: O ensaio imunoadsorvente ligado à enzima, ELISA, permite a detecção/quantificação da concentração de antígenos ou anticorpos. Dentre outras aplicações, este teste pode ser padronizado para detecção de anticorpos produzidos em resposta a antígenos de ectoparasitas.

II – Objetivo: O objetivo deste trabalho foi padronizar novos testes de ELISA para avaliar a imunidade humoral ao *Rhipicephalus microplus*, pela mensuração de IgG total, e das subclasses IgG1 e IgG2 em soro de bovinos.

III – Metodologia: Como antígenos, foram utilizados extratos solúveis de larvas (EL), e de intestinos (EI) ou glândula salivar (EGS) de adultos jovens do carrapato *R. microplus*, os quais foram adsorvidos a placas de 96 poços. A padronização de cada teste foi feita com a utilização de duas placas, uma controle negativo (soros pré-imune) e outra positivo (soros de bovinos coletados após sucessivas infestações artificiais com carrapato). Nas placas, os ensaios foram feitos por titulação cruzada, com diluições seriadas, tanto do antígeno, quanto do soro teste. Alguns parâmetros foram padronizados em todos os testes: diluição do antígeno em tampão carbonato-bicarbonato; Bloqueio com PBS + polisorbato 20 0,05% + leite desnatado 5%; Diluição das pastilhas de revelador conforme instrução do fabricante (SigmaFast OPD®); Parada das reações com H₂SO₄ 3M; Duração de 1 hora e temperatura de 37°C para todas incubações, exceto para o OPD, que foi de 15 minutos a temperatura ambiente; Leitura das amostras em leitor de microplacas a 492 nm.

IV – Resultados: Para a escolha das concentrações ideais de antígeno e soro teste a serem utilizadas, os antígenos (EL, EGS ou EI) foram diluídos na base dois, partindo de uma concentração inicial de 1,5 mg/mL, em 11 diluições seriadas, nos seguintes intervalos: EL: 1/25 a 1/25600; EGS: 1/50 a 1/51200; EI: 1/25 a 1/25600, para a padronização do ELISA para detecção de IgG total; EL: 1/12,5 a 1/12800; EGS: 1/50 a 1/51200; EI: 1/12,5 a 1/12800, para a padronização do ELISA para detecção de IgG1; EL: 1/12,5 a 1/12800; EGS: 1/12,5 a 1/12800; EI: 1/12,5 a 1/12800, para a padronização do ELISA para detecção de IgG2. Já o soro teste foi diluído na base dois, em oito diluições seriadas, nos seguintes intervalos: ELISA para detecção de IgG total: 1/50 a 1/3200. Detecção de IgG1: placas adsorvidas com EL e EI: soro diluído 1/12,5 a 1/800; placas adsorvidas com EGS: soro diluído 1/50 a 1/3200; Detecção de IgG2: soro diluído 1/12,5 a 1/800; Com os resultados da leitura foram confeccionados gráficos expressando as curvas de absorbância. A análise destas curvas e da razão entre absorbância no soro positivo/negativo permitiu a escolha das diluições dos extratos [antígeno (Ag)] e soro teste: ELISA para detecção de IgG total (conjugado 1/10.000 em todos): EL: Ag 1/200; Soro: 1/200; EGS: Ag 1/100; Soro 1/200; EI: Ag 1/800; soro 1/100. ELISA para detecção de IgG1 (conjugado 1/20.000 em todos): EL: Ag 1/25; Soro: 1/50; EGS: Ag 1/100; Soro 1/200; EI: Ag 1/25; soro 1/50. ELISA para detecção de IgG2 (conjugado 1/10.000 em todos): EL: Ag 1/50; Soro: 1/50; EGS: Ag 1/100; Soro 1/50; EI: Ag 1/12,5; soro 1/100.

V – Conclusão: Os testes de ELISA padronizados mostraram-se factíveis e de fácil execução, permitindo futuras avaliações de desenvolvimento e caracterização de resposta imune ao carrapato, em bovinos de diferentes raças e em indivíduos com diferentes graus de suscetibilidade ao carrapato.

Palavras-chave: carrapato; anticorpo; imunidade humoral

ABSTRACT

I - Introduction and Justification: The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) allows detection/quantification of antigens or antibodies concentrations. Among other applications, this test can be standardized for detecting antibodies raised in response to ectoparasite antigens.

II - Objective: The objective of this study was to standardize new ELISA tests to assess humoral immunity against *Rhipicephalus microplus*, by measuring total IgG, and subclasses, IgG1 and IgG2 in bovine serum.

III - Methodology: As antigens, soluble extracts from larvae (EL) and intestines (EI) or salivary gland (EGS) from young adult *R. microplus* were used. Each antigen was adsorbed to 96 well plates. The standardization of each test was made by the use of two plates, one negative control (pool of pre-immune bovine sera) and one positive (pool of bovine sera collected after successive artificial infestation with ticks). The standardization by chessboard was performed with serial dilutions of both, the antigen and the serum test. Some parameters were fixed in all tests: antigen diluted in carbonate-bicarbonate buffer; Blocking with PBS + 0.05% polysorbate 20 + 5% skimmed milk; Detection tablets were diluted according to manufacturer's instruction (SigmaFast OPD®); The reaction was stopped with H₂SO₄ 3M; All incubations, except for OPD, spent 1 hour at 37 °C. OPD was incubated by 15 minutes at room temperature; Absorbances were measured in microplate reader at 492 nm.

IV - Results: For the choice of optimal concentrations of antigen and serum test to be used, the antigens (EL, EGS or EI) were diluted in base two, starting with an initial concentration of 1.5 mg/ml in 11 serial dilution, in the following ranges: EL: 1/25 to 1/25600; EGS: 1/50 to

1/51200; EI: 1/25 to 1/25600, to the standardization of the ELISA for total IgG detection; EL: 1/12.5 to 1/12800; EGS: 1/50 to 1/51200; EI 1/12.5 to 1/12800, to standardize ELISA for IgG1 detection; EL: 1/12.5 to 1/12800; EGS: 1/12.5 to 1/12800; EI 1/12.5 to 1/12800, to standardize ELISA for detection of IgG2. The serum test was also diluted in base two, in eight serial dilutions in the following ranges: ELISA for total IgG detection: 1/50 to 1/3200. IgG1 Detection: plate adsorbed with EL and EI: serum diluted 1/12.5 to 1/800; Plates adsorbed with EGS: serum diluted 1/50 to 1/3200; Detection of IgG2: serum diluted 1/12.5 to 1/800; After reading, graphs expressing the absorbance curves were constructed. Analysis of these curves and the ratio of absorbance in serum positive/negative allowed the choice of dilutions of the extracts [antigen (Ag)] and serum test: ELISA for total IgG detection (conjugate 1/10,000 in all): EL: Ag 1/200; Serum: 1/200; EGS: Ag 1/100; Serum 1/200; EI: Ag 1/800; Serum 1/100. ELISA for IgG1 detection (conjugate 1/20,000 in all): EI Ag 1/25; Serum: 1/50; EGS: Ag 1/100; Serum 1/200; EI: Ag 1/25; 1/50 sera. ELISA for IgG2 (conjugate 1/10,000 in all): EL: Ag 1/50; Serum: 1/50; EGS: Ag 1/100; Serum 1/50; EI: Ag 1/12.5; Serum 1/100.

V - Conclusion: The standardized ELISA tests proved to be feasible and easy to perform, allowing future evaluations of development and characterization of immune response against tick in cattle of different breeds and individuals with varying degrees of susceptibility to tick.

Keywords: tick; antibody; humoral immunity

INTRODUÇÃO

De acordo com o Centro de Estudos Avançados de Economia Aplicada, da Universidade de São Paulo (Cepea/USP) o setor agropecuário no Brasil corresponde a aproximadamente 21% do produto interno bruto (PIB), perfazendo 1,27 trilhões de reais em 2015 (CEPEA/ESALQ/USP, 2016), sendo, portanto, um setor altamente relevante para a economia do país (AMORIM et al., 2009). Problemas sanitários correspondem a mais de 20% de perda na produção de animais ao redor do mundo (VALLAT & WILSON, 2003). A infestação pelo carrapato do boi [*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)] é um dos principais problemas sanitários para a bovinocultura em regiões tropicais e subtropicais do mundo (RODRIGUEZ et al., 1995) e um dos principais fatores limitantes ao aumento da produtividade na pecuária bovina brasileira, especialmente na criação de animais de origem europeia, uma vez que *Bos taurus taurus*, quando comparados a *Bos taurus indicus*, têm maior suscetibilidade a infestações por carrapatos (FRISCH, 1999).

Na região sul do Brasil, incluindo o Rio Grande do Sul, o problema relacionado ao carrapato é mais grave que nas demais regiões, primeiro porque nesta região predomina a criação de bovinos de origem europeia, segundo porque, nesta região, as condições climáticas causam uma queda populacional de carrapatos nos meses de baixa temperatura (ALVES-BRANCO et al., 2000) o que gera instabilidade enzoótica com relação à TPB,

impedindo a imunização natural e constante dos animais contra *Babesia* e *Anaplasma*, o que favorece a ocorrência de surtos dessa doença quando a população de carrapatos volta a crescer.

No último século, o controle do *R. (B.) microplus* tem sido baseado quase que exclusivamente no uso de acaricidas. Entretanto, o controle químico como estratégia única, apesar da grande eficiência, tem se tornado preocupante devido ao aumento contínuo do número de populações de carrapato resistentes aos acaricidas (FURLONG et al., 2007). Desta forma urge a necessidade de investimento em pesquisa de novas formas de controle que possam reduzir a o uso de agentes químicos, como o desenvolvimento de novos imunógenos.

É inegável que o fenômeno de resistência aos carrapatos esteja intimamente relacionado a mecanismos imunológicos (REGITANO & PRAYAGA, 2010). Infelizmente, porém, estes mecanismos são complexos e não foram, até o momento, completamente elucidados. O conhecimento destes mecanismos tem o potencial de favorecer o desenvolvimento de métodos de controle baseados na imunização. Por outro lado, embora os bovinos sejam capazes de desenvolver uma resposta imunológica após exposições sucessivas aos carrapatos (DOSSA et al. 1996), o desenvolvimento de vacinas de alta eficiência ainda não foi bem sucedido (BROSSARD; WIKEL 2004), em parte devido ao desconhecimento dos mecanismos imunológicos da resposta à infestação e também devido à complexidade antigênica do carrapato.

Uma das formas de se estudar a resposta imunológica é por meio do teste de ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”, ou ensaio imunoadsorvente ligado à enzima). ELISA é um teste que se destaca entre os métodos imunológicos desenvolvidos para detectar e/ou estimar a concentração de antígenos ou anticorpos em uma amostra biológica por conferir maior especificidade e sensibilidade que a maioria dos demais testes imunológicos (GAN; PATEL, 2013) e tem sido amplamente utilizado como ferramenta diagnóstica tanto em medicina humana (GAN; PATEL, 2013) quanto veterinária (MADRUGA et al., 2001).

Para estudos da relação parasito-hospedeiro (como carrapatos e bovinos), este teste permite o acompanhamento do desenvolvimento da resposta imunológica humoral nos bovinos, comparativamente entre animais resistentes e susceptíveis, previamente fenotipados como tais, o que, no futuro poderá contribuir para a elucidação de mecanismos imunológicos envolvidos na resistência genética dos bovinos ao carrapato.

Para que um teste de ELISA seja realizado é necessário que seja feita uma padronização minuciosa, que possibilita a escolha das concentrações ótimas de antígeno e soro teste a serem usadas. Neste trabalho, foi realizada a padronização de testes de ELISA indiretos para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2 contra antígenos de larvas, glândulas salivares e intestino de *R. (B.) microplus*. IgG total é composta por três subclasses: IgG1, IgG2 e IgG3. IgG1 corresponde a 50% da IgG sérica total e é a imunoglobulina predominante no leite de vaca (cerca de 90%) (NASH et al., 1990; TIZARD et al., 2013). É importante estudar a resposta imunológica contra as subclasses de imunoglobulinas, pois estas podem ter funções distintas na resposta imunológica. Tanto IgG1 quanto IgG2 bovinas inibem a atividade mitogênica estimulada pelo mitógeno PWM, mas só IgG1 inibe a secreção de anticorpos por células B humanas (NASH et al., 1990). Ambas as subclasses fixam complemento de bovino, mas apenas IgG1 fixa complemento de coelhos. IgG2 é precipitante, enquanto IgG1, não o é. Apenas IgG2 causa fagocitose e aderência de eritrócitos equinos por neutrófilos e monócitos periféricos de bovinos (McGUIRE et al., 1979). IL-4 bovina induz preferencialmente a produção de IgG1 e IgE, enquanto IFN- γ induz preferencialmente a produção de IgG2 (ESTES et al., 1994; ESTES et al., 1995).

O objetivo deste trabalho foi padronizar novos testes de ELISA para avaliar a imunidade humoral ao *Rhipicephalus microplus*, pela mensuração de IgG total, e das subclasses IgG1 e IgG2 produzidos contra antígenos de larvas, glândulas salivares e intestino de *R. (B.) microplus* no soro de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de antígeno

Obtenção dos carrapatos

Bovinos da raça holandesa foram infestados artificialmente com linhagens de carrapato livres dos agentes de TPB. Fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram coletadas destes animais doadores, para obtenção de larvas. Glândulas salivares e intestinos foram obtidos a partir de partenóginas.

Extrato de larvas não alimentadas (EL)

Fêmeas de carrapato foram coletadas e mantidas a 28 °C com umidade relativa de 70-80% (BOD) para oviposição. Sete dias após a eclosão as larvas foram mantidas por 10 minutos a -20 °C para anestesiá-las. Às larvas foram adicionados 500 µL de solução salina tamponada (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*) e estas foram trituradas em gral/pistilo. Ao macerado foram adicionados 2,5 mL de PBS e o material foi sonificado três vezes por um minuto, com intervalo de um minuto, a 40% da frequência máxima do sonicador, sobre gelo. O material foi centrifugado (14.000 g/30 min.). O sobrenadante constitui o extrato de larva e foi estocado a -20 °C.

Extrato de glândulas salivares (EGS)

Fêmeas de carrapato menores que 4 mm, alimentadas em bovinos foram coletadas para a dissecação e extração das glândulas salivares com auxílio de microscópio estereoscópico. Após extração estas foram colocadas em tampão contendo inibidor de protease (30 glândulas em 500 µL de tampão) e imediatamente congeladas a -20 °C. Posteriormente, as glândulas foram descongeladas e misturadas por pipetagem, por 30 vezes, para destruir o tecido glandular. O conteúdo foi transferido para um tubo maior e sonificado três vezes por um minuto, com intervalo de um minuto, a 40% da frequência máxima do sonicador, sobre gelo. O material foi centrifugado (14.000 g/30 min.). O sobrenadante constitui o extrato hidrossolúvel de glândulas salivares e foi estocado a -20 °C.

Extrato de intestino (EI)

Fêmeas de carrapato menores que 4 mm, alimentadas em bovinos foram coletadas para a dissecação e extração dos intestinos sob lupa. Cada 20 intestinos extraídos foram colocados em 500 µL de tampão contendo inibidor de protease e congelados a -20 °C. No momento da confecção do extrato, os intestinos foram descongelados e misturados por pipetagem, por 30 vezes, para destruir o tecido intestinal. O conteúdo foi transferido para um tubo maior e sonificado três vezes por um minuto, com intervalo de um minuto, a 40% da frequência máxima do sonicador, sobre gelo. O material foi centrifugado (14.000 g/30 min.). O sobrenadante constitui o extrato hidrossolúvel de intestino e foi estocado a -20 °C.

Quantificação de proteína

A quantificação do conteúdo proteico dos extratos foi realizada por colorimetria com o kit *DC Protein Assay* (BIO-RAD), que é similar ao ensaio Lowry (LOWRY et al. 1951).

Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA, do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”)

Após a confecção dos extratos passou-se à etapa da padronização do teste de ELISA propriamente dito. Para cada extrato (EL, EGS ou EI) a padronização foi independente, e foram utilizadas duas placas, uma controle negativo (*pool* de soros pré-imune) e outra controle positivo (*pool* de soros de bovinos coletados após sucessivas infestações artificiais com carrapato). Nas placas, os ensaios foram feitos por titulação cruzada, com diluições seriadas, tanto do antígeno, quanto do soro teste (Figura 1).

Alguns parâmetros foram os mesmos em todos os testes: a diluição seriada do antígeno foi realizada em tampão carbonato-bicarbonato; As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C; na sequência foi realizado o bloqueio com PBS acrescido de 0,05% de polisorbato 20 (PBS-T) e 5% de leite desnatado 5%, por uma hora a 37 °C; Foi realizada a incubação com o soro teste, em diluição seriada por 1 h a 37 °C; As pastilhas de revelador foram diluídas conforme instrução do fabricante (SigmaFast OPD®) e a solução de revelação foi incubada nas placas por 15 minutos; A reação foi parada com H₂SO₄ 3M; A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm; Entre cada uma das etapas as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T; Os resultados de absorbância foram utilizados para a confecção de gráficos que permitiram a escolha da melhor concentração de antígeno e anticorpo a serem utilizados. Para cada um dos extratos foram padronizados testes para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2 bovinos.

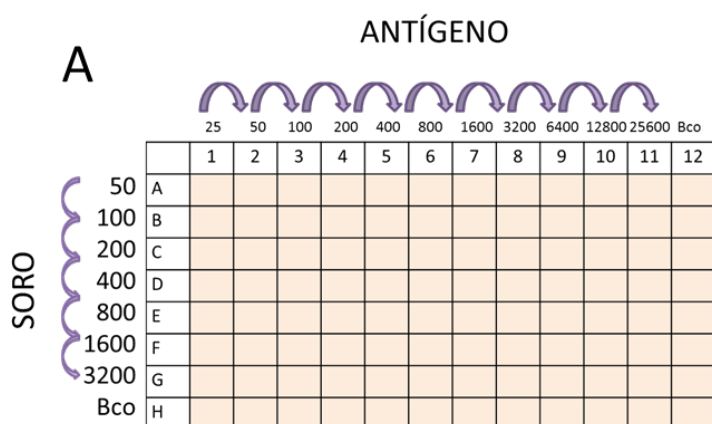


Figura 1. (A) Esquema da placa de 96 poços mostrando como foi feita a titulação cruzada, sendo que, para cada antígeno a ser padronizado foram feitas duas placas, uma para o soro controle positivo outra para o soro controle negativo. (B) Placa de 96 poços utilizada na padronização do teste de ELISA, no momento pós-leitura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização da resposta imunológica em animais susceptíveis e resistentes ao carrapato poderá, no futuro, contribuir na identificação de diferenças nesta resposta, que possam explicar a variação na susceptibilidade ao carrapato ou, ainda, auxiliar na identificação de antígenos mais importantes na proteção contra a infestação, para o desenvolvimento de novas vacinas.

Existem diferentes metodologias que permitem a caracterização da resposta imunológica, dentre estas metodologias o ELISA apresenta uma série de vantagens. É um teste relativamente simples, cujo equipamento específico para leitura é facilmente disponível, é rápido, sensível, os reagentes são fáceis de serem adquiridos e de baixo custo, com boa aceitabilidade, e é facilmente padronizável (CROWTHER, 2000; FAIR, 2007).

Entretanto, para que o teste de ELISA possa ser aplicado ao objetivo de caracterizar a resposta imunológica ao carrapato, este precisa ser previamente padronizado. No presente trabalho a padronização foi feita por titulação cruzada (Figura 1), de acordo com o proposto por CROWTHER, 2000. A padronização por titulação cruzada (*checkerboard* ou *chessboard* em inglês) tem sido amplamente utilizada na padronização da técnica de ELISA (WINDISCH; HESS, 2009; KOLIARAKI et al., 2009; Perera; Murray, 2009; Berrizbeitia et al., 2012). Este é um método fácil e prático de padronização e apresenta a vantagem de permitir múltiplas combinações de diferentes diluições de antígeno e soro teste (anticorpo), no caso da padronização do ELISA indireto.

Neste trabalho, foram padronizados nove testes de ELISA indireto: para detecção de IgG total, IgG1 e IgG2 bovinas produzidas contra antígenos de larva, glândula salivar e intestino de carrapatos. A padronização de testes para diferentes subtipos de imunoglobulina é importante, pois estes apresentam funções diferenciadas e sua produção é influenciada por diferentes citocinas. Exemplificando, IgG total é composta por três subclasses: IgG1, IgG2 e IgG3 (NASH et al., 1990; TIZARD et al., 2013). Só IgG1 inibe a secreção de anticorpos por células B humanas (NASH et al., 1990). Apenas IgG1 fixa

complemento de cobaios. IgG2 é precipitante, enquanto IgG1, não o é. Apenas IgG2 causa fagocitose e aderência de eritrócitos equinos por neutrófilos e monócitos periféricos de bovinos (McGUIRE et al., 1979). Enquanto que IL-4 bovina induz preferencialmente a produção de IgG1 e IgE, IFN- γ induz preferencialmente a produção de IgG2 (ESTES et al., 1994; ESTES et al., 1995; ESTES; BROWN, 2002).

Neste trabalho, para a escolha das concentrações ideais de antígeno e soro teste a serem utilizadas, os antígenos (EL, EGS ou EI) foram diluídos na base dois, partindo de uma concentração inicial de 1,5 mg/mL, em 11 diluições seriadas. Já os soros foram diluídos, também na base dois, mas em 7 diluições seriadas, conforme demonstrado na figura 1.

As diluições iniciais e finais tanto dos extratos (antígeno) quanto do soro teste são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Diluições iniciais e finais do extrato (antígeno) e soro teste (anticorpo) usadas na titulação cruzada para escolher as concentrações de uso. Como antígeno foram usados extratos de larvas (EL), glândula salivar (EGS) ou intestino (EI) de carrapatos. Como soro teste foram usados soros controle negativo (animais naïve) e controle positivo (animais sabidamente expostos à infestação por carrapatos).

Subtipo de anticorpo a ser detectado	Extrato	Extrato (antígeno)		Soro teste	
		Diluição inicial	Diluição final	Diluição inicial	Diluição final
IgG total	EL	1/25	1/25600	1/50	1/3200
	EGS	1/50	1/51200	1/50	1/3200
	EI	1/25	1/25600	1/50	1/3200
IgG1	EL	1/12,5	1/12800	1/12,5	1/800
	EGS	1/50	1/51200	1/50	1/3200
	EI	1/12,5	1/12800	1/12,5	1/800
IgG2	EL	1/12,5	1/12800	1/12,5	1/800
	EGS	1/12,5	1/12800	1/12,5	1/800
	EI	1/12,5	1/12800	1/12,5	1/800

Para a escolha da diluição ideal tanto de antígeno quanto de soro teste a ser utilizada, os resultados das leituras de absorvância das placas são transformados em um gráfico, o qual é usado para definir as concentrações ideais. Também é confeccionada uma tabela com as razões entre as absorvâncias nos soros positivos/negativos, pois, no ponto ideal, a diferença entre a absorvância lida no controle positivo e no controle negativo deve permitir a distinção de ambos. A figura 2 representa um exemplo destes gráficos. Neste caso foram usados como antígeno extrato de larvas e, como anticorpo de detecção, anti-

IgG total. No eixo x constam cada uma das diluições do extrato de larvas (antígeno) e no eixo y as absorbâncias lidas. As concentrações escolhidas foram 1/200, tanto do extrato de larvas, quanto do soro teste, uma vez que, ao olhar para a curva que representa a diluição 1/200 do soro, é possível notar que a diluição 1/200 do antígeno encontra-se dentro do platô de absorbância. Na escolha das diluições ideais tenta-se optar pelas maiores diluições (ou menores concentrações) que ofereçam um teste com qualidade. Desta forma evita-se o desperdício de material, assegurando-se a qualidade do teste. Ao escolher uma concentração de antígeno dentro do platô da curva assegura-se que todos os sítios da placa estejam recobertos com antígeno. Outro dado utilizado é a razão entre as absorbâncias lidas na placa positiva/placa negativa (Tabela 2). Neste caso, no ponto escolhido a razão é de 1,84, ou seja, a absorbância lida no controle positivo é quase o dobro da lida no controle negativo, assegurando a distinção entre um e outro. Apesar do exemplo mostrar a curva de absorbância apenas para EL revelado com anti-IgG total, o mesmo raciocínio foi usado para a escolha de cada uma das concentrações de uso. Estas concentrações estão apresentadas na Tabela 3.

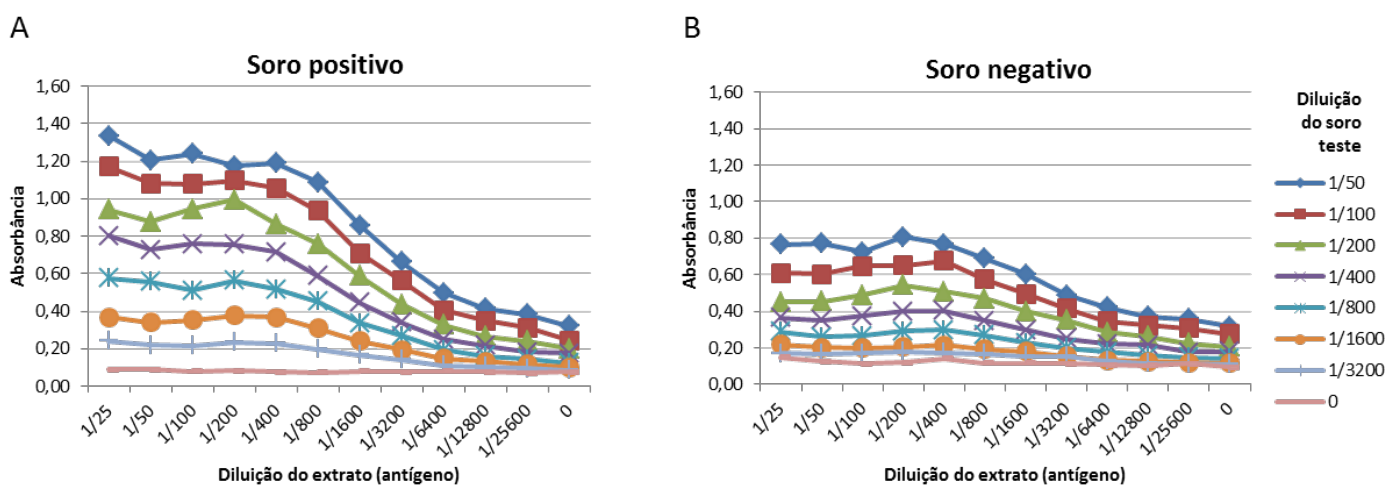


Figura 2. Titulação cruzada soro versus extrato de larvas. Anti-IgG total bovino usado como anticorpo de detecção. (A) Soro controle positivo; (B) Soro controle negativo.

Tabela 2. Razão entre absorvâncias do soro controle positivo/soro controle negativo para titulação cruzada soro versus extrato de larvas

		Diluição do extrato de larvas (antígeno)											
		1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	0
		5	0	0	0	0	0	00	00	00	00	00	0
Diluição do soro	1/50	1,7 4	1,5 6	1,71	1,45	1,55	1,58	1,43	1,35	1,19	1,12	1,07	1,0 2
	1/100	1,9 2	1,7 9	1,66	1,68	1,56	1,63	1,43	1,36	1,18	1,08	1,02	0,8 9
	1/200	2,1 0	1,9 4	1,94	1,84	1,70	1,62	1,48	1,25	1,16	1,02	1,07	0,9 8
	1/400	2,2 2	2,0 6	2,04	1,90	1,78	1,70	1,50	1,37	1,14	1,02	1,04	0,9 9
	1/800	2,0 0	2,1 5	1,93	1,93	1,75	1,68	1,49	1,35	1,10	1,03	0,99	0,8 7
	1/1600	1,6 9	1,7 1	1,77	1,86	1,73	1,60	1,36	1,27	1,13	1,08	1,00	0,8 9
	1/3200	1,4 2	1,3 3	1,26	1,31	1,33	1,21	1,08	0,94	0,89	0,92	0,85	0,8 0
	0	0,6 1	0,7 1	0,70	0,69	0,56	0,64	0,70	0,67	0,74	0,76	0,63	0,8 3

Tabela 3. Concentrações escolhidas de extrato (antígeno) e soro teste para cada um dos nove testes de ELISA padronizados.

Subtipo de anticorpo a ser detectado	Extrato	Diluição escolhida		
		Extrato (antígeno)	Soro teste	Conjugado
IgG total	EL	1/200	1/200	
	EGS	1/100	1/200	1/10000
	EI	1/800	1/100	
IgG1	EL	1/25	1/50	
	EGS	1/100	1/200	1/20000
	EI	1/25	1/50	
IgG2	EL	1/50	1/50	
	EGS	1/100	1/50	1/10000
	EI	1/12,5	1/100	

CONCLUSÃO

Os testes de ELISA padronizados mostraram-se factíveis e de fácil execução, permitindo futuras avaliações de desenvolvimento e caracterização de resposta imune ao carrapato, em bovinos de diferentes raças e em indivíduos com diferentes graus de suscetibilidade ao carrapato.

REFERÊNCIAS

ALVES-BRANCO, F. P. J.; PINHEIRO, A. C.; SAPPER, M. F. M. Controle dos principais ectoparasitos e endoparasitos em bovinos de corte no Rio Grande do Sul. *Série Documentos*, Embrapa Pecuária Sul, n.18, 2000.

AMORIM, A. L.; CORONEL, D. A.; TEIXEIRA, E. C. A agropecuária na economia brasileira: uma análise de insumo de produto. Apresentação Oral. Evolução e estrutura da agropecuária no Brasil. SOBER, In.: 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, Porto Alegre, 2009.

BERRIZBEITIA, M.; FIGUEROA, M.; WARD, B. J.; RODRÍGUEZ, J.; JORQUERA, A., FIGUERA, M. A., ROMERO, L.; NDAO, M. Development and application of an ELISA assay using excretion/secretion proteins from epimastigote forms of *T. cruzi* (ESEA antigens) for the diagnosis of Chagas disease. *Journal of tropical medicine*, v. 2012, 7p., 2012.

BROSSARD, M.; WIKEL, S. K. Tick immunobiology. *Parasitology*. v. 129, n. S1, p. S161–S176, 2004.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA/ESALQ/USP). Disponível em: <http://cepea.esalq.usp.br/pib>. Acessado em 03/08/2016.

CROWTHER JR. *The ELISA Guidebook*. Methods in Molecular Biology. Springer Science & Business Media. First ed. 2000. 436 p.

DOSSA, S. C., KAAYA, G. P., ESSUMAN, S., ODULAJA, A., & ASSOKU, R. G. K. Acquisition of resistance to the tick *Amblyomma variegatum* in Boran cattle, *Bos indicus* and the effects of *Trypanosoma congolense* and *Babesia bigemina* on host resistance. *Veterinary parasitology*, v. 62, n. 3, p. 317-330, 1996.

ESTES, D. M., & BROWN, W. C. Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 90, n. 1, p. 1-10, 2002.

ESTES, D. M., CLOSSER, N. M., & ALLEN, G. K. IFN- γ stimulates IgG 2 production from bovine B cells costimulated with anti- μ and mitogen. *Cellular immunology*, v. 154, n. 2, p. 287-295, 1994.

ESTES, D. M., HIRANO, A., HEUSSLER, V. T., DOBBELAERE, D. A., & BROWNS, W. C. Expression and biological activities of bovine interleukin 4: effects of recombinant bovine

interleukin 4 on T cell proliferation and B cell differentiation and proliferation in vitro. *Cellular immunology*, v. 163, n. 2, p. 268-279, 1995.

FAIR, J. N. Development and characterization of recombinant Lassa virus proteins and monoclonal antibodies for diagnostic applications. ProQuest, 2007.

FRISCH, J. E. Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. *International Journal For Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 57-71, 1999.

FURLONG, J.; SALES, R. O. Controle Estratégico de Carrapatos no Bovino de Leite: Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 1, n. 2, p.44-72, 2007.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 9, p. 1-3, 2013.

KOLIARAKI, V., MARINOU, M., VASSILAKOPOULOS, T. P., VAVOURAKIS, E., TSOCHATZIS, E., PANGALIS, G. A.; PAPTAEODORIDIS, G.; STAMOULAKATOU, A; SWINKELS, D. W.; PAPANIKOLAOU, G.; MAMALAKI, A. (2009). A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS One*, v. 4, n. 2, p. e4581

LOWRY, O.H; ROSBROUGH, N. J.; FARR, A. L; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent *Journal of Biological Chemichal* 193: 265, 1951.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Embrapa. Campo Grande. 2001. 360 p.

MCGUIRE, T. C.; MUSOKE, A. J.; KURTTI, T. Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: interaction with complement, macrophages, neutrophils and skin. *Immunology*, v. 38, n. 2, p. 249, 1979.

NASH, G. S.; MACDERMOTT, R. P.; SCHLOEMANN, S.; BERTOVICH, M. J.; O'NEAL, J.; PORTER, L.; KULCZYCKI, A. Bovine IgG1, but not IgG2, binds to human B cells and inhibits antibody secretion. *Immunology*, v. 69 n. 3, p. 361, 1990.

PERERA, K.; MURRAY, A.. Development of an indirect ELISA for the detection of serum IgG antibodies against region IV of phase 1 flagellin of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg in sheep. *Journal of medical microbiology*, v. 58, n. 12, p. 1576-1581, 2009.

REGITANO, L. C. A.; PRAYAGA, K. (2010) Ticks and Tick-Borne Diseases in Cattle. Breeding for Disease Resistance in Farm Animals, 3rd Edition. 2010, 295-315 p.

RODRÍGUEZ, M.; MASSARD, C. L.; da FONSECA, A. H.; RAMOS, N.F.; MACHADO, H.; LABARTA, V; De La FUENTE, J. [Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of Boophilus microplus in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil.](#) *Vaccine*, v.13, n. 18, p. 1804-1808, 1995.

TIZARD, I. R. (2013). Veterinary immunology. Elsevier Health Sciences.

[VALLAT, B.](#); [WILSON, D.W.](#) The obligations of Member Countries of the OIE (World Organisation for Animal Health) in the Organization of Veterinary Services. [Revue scientifique et technique.](#) v. 22, n. 2, p. 547-559, 2003.

WINDISCH, M.; HESS, M. Establishing an indirect sandwich enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Histomonas meleagridis* from experimentally infected specific pathogen-free chickens and turkeys. *Veterinary parasitology*, v. 161, n. 1, p. 25-30, 2009.