

# AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM ENSAIO DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Anaplasma marginale* THEILER, 1910

Soares C.O.<sup>1</sup>; Madruga C.R.<sup>2</sup>; Cunha N.C.<sup>3</sup>(\*); Madureira R.C.<sup>3</sup>; Scofield A.<sup>3</sup> e Souza J.C.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária (CPGMV-PV), UFRRJ. Seropédica, RJ 23890-000.;

<sup>2</sup>Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPq), EMBRAPA.

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica/ CNPq/PIBIC

Desenvolveu-se um ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto para detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Anaplasma marginale* em bovinos, baseando-se na interação antígeno, anticorpos e conjugado. Utilizou-se como controle positivo o soro de um bovino inoculado experimentalmente com uma cepa pura de *A. marginale* e como controles negativos os soros de um bovino mantido em ambiente isolado, no Brasil e, de outros 13 animais importados do Canadá, provenientes de uma área livre de *A. marginale*. Microplacas de poliestireno com 96 orifícios foram usadas para avaliar a interação de quatro concentrações de antígeno (2,0; 4,0; 8,0 e 16,0µg/mL) contra três diluições de anticorpos (1:500; 1:1000 e 1:2000) e quatro diluições de conjugado IgG de coelho anti-IgG bovina marcada com fosfatase alcalina (1:1000; 1:2000; 1:6000 e 1:12000). Utilizou-se como substrato-cromógeno para-nitrofenil fosfato na concentração de 20mg/ml em tampão glicina pH 10,5. A avaliação das interações e suas concentrações teve como base análises estatística e gráfica. Na concentração de antígeno de 8,0µg/mL os valores de densidade óptica (DO) foram altos frente a diluição dos soros a 1:500, diferindo-se das demais concentrações. Quando analisada cada diluição do conjugado pôde-se observar que à 1:1000 apresentou valor de DO distante dos demais, revelando às análises estatística e gráfica ser esta a ideal. O ensaio foi determinado utilizando para sensibilização antígeno a 8,0µg/mL, soros testes bem como os controles negativos diluídos a 1:500; controle positivo diluído em série crescente de 1:500 a 1:64000 e conjugado a 1:1000. A análise dos controles negativos demonstrou que a média das DOs destes encontraram-se abaixo do valor observado na maior diluição do controle positivo (1:64000). A linha de corte do ensaio foi estabelecida pela média aritmética dos valores de DOs dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão destes, o que garante um intervalo de confiança de 99,99%; o título mínimo de positividade de 1:500 reduz as possibilidades de reações cruzadas. No ensaio desenvolvido os soros testes são, também, avaliados segundo a sua titulação de anticorpos. O ELISA indireto padronizado apresentou um coeficiente de variação baixo frente a repetibilidade, e altas sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizado como auxílio diagnóstico e epidemiológico.