

Desenvolvimento de *dot-blot* para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos

The development of *dot-blot* for the detection of antibodies to Caprine Arthritis Encephalitis virus in goat

Raymundo Rizaldo Pinheiro*¹, Carlos Delfin Chaves Olortegui², Aurora Maria Guimarães Gouveia³, Simone Costa Araujo², Alice Andrioli¹

¹Embrapa Caprinos - Estrada Sobral-Groairas, Km 04. Caixa Postal D10 Sobral-CE - Brasil.

²Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais

Resumo: A técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é empregada mundialmente como método de triagem e monitoramento das fases iniciais de programas de controle das lentiviroses de pequenos ruminantes, mas apesar da boa especificidade, a IDGA pode apresentar resultados falso-negativos. Este trabalho teve como objetivo padronizar o teste Dot-Blot (DB) para a detecção de anticorpos, em caprinos, contra o Lentivírus Caprino (LVC), utilizando antígeno experimental preparado a partir do vírus total, e compará-lo com a IDGA e com ELISA indireto (ELISA-i). Na realização do (DB) a membrana de nitrocelulose (MN) foi disposta num aparelho de blot de 96 poços acrescentando antígeno com uma concentração de 0,5 mg de proteína/poço. Colocaram-se as tiras de MN em tubos de ensaio contendo soro teste diluído (1:50). Após, distribuiu-se o conjugado (peroxidase IgG coelho anti-cabra) diluído 1:500 em PBS-T e revelou-se a MN numa solução de DAB/4-Cloronaphtol. Num total de 327 amostras verificou-se que o ELISA-i detectou 209 caprinos positivos, o DB detectou 200, enquanto a IDGA detectou 144 animais. O DB mostrou concordância de 90,2% ($p < 0,01$) com o ELISA-i. O DB é um teste mais sensível que a IDGA e comparável ao ELISA-i, além de não necessitar da instrumentação tecnológica do ELISA-i, podendo ser utilizado em eventos agropecuários ou até mesmo na propriedade.

Palavras-chave: Caprino, Lentivírus, Diagnóstico, Dot-Blot.

Summary: The immunodiffusion in agar gel technique (IDGA) is used worldwide as a screening method of monitoring the initial phases of programs to control lentivirose of small ruminants. Despite of the good specificity, the IDGA can present false-negative results. The objective of this work was to standardize the Dot-Blot test (DB) for the detection of antibodies against Lentivírus Caprine (LVC), using a prepared experimental antigen from the total virus. The DB was compared with the IDGA and indirect ELISA (ELISA-i) tests. The DB test was accomplished by used a nitrocellulose membrane (MN) in a device of blot of 96 wells and the antigen placed in a concentration of 0.5 mg of protein/well. The strips of MN placed in separated tubes and serum tests added at dilution of 1:50. After that, the conjugated peroxidase IgG rabbit anti-goat diluted 1:500 in PBS-T was incubated for 60 minutes. The DAB/4-Cloronaphtol solution

was used to reveal the reaction. From a total of 327 samples, we verified that the ELISA-i detected 209 positives goat, the DB detected 200, while the IDGA 144 animals. The DB showed agreement of 90.2% ($p < 0.01$) with the ELISA-i. The DB is a test more viable than the IDGA and comparable to the ELISA-i test. Besides being more sensible than the IDGA, it does not need the technological equipment of the ELISA-i, being able to be used in animals for events or in the field.

Keywords: Goat, Lentivirus, Dot-Blot

Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma infecção causada por lentivírus e encontrada em todos os continentes (Adams et al., 1984), com alta prevalência nos rebanhos mais tecnificados para a produção leiteira (Rowe e East, 1997), causando consideráveis perdas econômicas para a produção caprina (Greenwood, 1995).

Devido aos custos menores e à praticidade, os métodos sorológicos são largamente usados na detecção de anticorpos contra os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), sendo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) os mais usados. Estes testes podem diferir no método de preparo do antígeno ou na cepa de vírus usada e desta forma no conteúdo e espectro de proteínas virais (Celer Jr. et al., 1998).

Existe um interesse crescente no diagnóstico sorológico dos LVPR usando técnicas rápidas, simples e de baixo custo. O Dot-Blot (DB) é um teste atrativo com alta sensibilidade para aplicação de rotina, em virtude dos procedimentos permitirem a realização de dezenas de ensaios em tira de nitrocelulose para detecção de anticorpos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver o teste DB para a detecção de anticorpos contra LVPR, em

*Correspondência: rizaldo@cnpq.embrapa.br

caprinos, utilizando antígeno experimental preparado a partir do vírus total, comparar com a IDGA utilizando antígeno comercial e com o ELISA indireto (ELISA-i).

Material e métodos

Produção do antígeno

Na produção de suspensões e titulações do lentivírus caprino (LVC) foram utilizados cultivos secundários de células de membrana sinovial caprina (MSC) obtida por explant a partir de cabrito comprovadamente negativo para LVPR.

Para a produção da suspensão viral, utilizou-se amostra padrão (CAEV-Cork, gentilmente cedida pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, oriunda do Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants – INRA, ENVL, France) do LVC com título inicial de 10-5,3 TCID50/mL. O título, calculado segundo Reed e Muench (1938), foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou, 14 dias após inoculação, sincícios em 50% dos poços inoculados, correspondendo a uma dose formadora de sincício (DFS). Monocamadas semiconfluentes (70 a 90% de confluência) de MSC cultivadas em garrafas roller foram inoculadas, 72 a 96 horas após passagem com 200 DFS/ML. Coletou-se o sobrenadante, semanalmente, por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada. Os sobrenadantes coletados, bem como as garrafas na última coleta foram conservados a – 80 °C para produção do antígeno.

Na produção do antígeno, os sobrenadantes das coletas iniciais e o conteúdo das garrafas congeladas sofreram dois ciclos de congelamento e descongelamento e foram clarificados por centrifugação a 3.300 g a 4 °C por 20 minutos. A suspensão clarificada foi precipitada com PEG-8000 a 40% até a concentração final de 8%, por 18 h a 4 °C, sob lenta agitação, seguida de nova centrifugação a 4 °C a 12000 g por 60 min (Reis e Leite, 1994). O sedimento foi suspenso em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0 mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral e ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42000 g por 120 min a 4 °C (Houwens et al., 1982). O sedimento foi suspenso em PBS (0,05 M; 0,15 M NaCl; pH 7,4) contendo 2×10^{-4} M de phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e o antígeno mantido a 4 °C até a realização dos ensaios imunoenzimáticos.

Controle negativo

Um controle negativo (antígeno de cobertura negativo) foi preparado com células de MSC e submetidas ao mesmo processo aplicado nas células infectadas, com o objetivo de verificar a influência das proteínas celulares na especificidade do DB.

Produção do conjugado

As imunoglobulinas (IgG's) foram obtidas por precipitação com sulfato de amônio (McKinney e Parkinson, 1987). Utilizou-se a cromatografia por afinidade em coluna de proteína A imobilizada em sefarose CL-4B pelo método do brometo cianogênico (Pharmacia Biotech. Cat. N° 17-0780-01) para purificação das IgG. A proteína total foi dosada (Lowry et al., 1951) e as IgG's purificadas foram liofilizadas. O soro hiperimune, foi obtido por inoculação de coelhos jovens, segundo Hurn e Chantler (1980), por via subcutânea, com 1,0 mg de IgG caprina emulsificada em adjuvante completo de Freund. Conjugou-se o soro hiperimune com peroxidase (Sigma. Cat. N° P 8375) através do método do periodato (Nakane e Kawoi, 1974).

Dot-Blot (DB)

O DB foi desenvolvido e padronizado a partir da metodologia descrita por Stott (1989). A membrana de nitrocelulose (MN) (Membrana de nitrocelulose SIGMA Dura-blottm, com poro de 0,45 mm. Cat. N° N 9641) foi dividida em partes de 11 x 7,5 cm, e disposta num aparelho de blot (Minifoldtm SRC-96, Schleicher & Schuell, INC. Keene, N.H.) de 96 poços onde adicionou-se, em cada poço, 35 µL de uma solução de PBS-T (PBS Tween-20 a 0,05%) e Ag numa concentração de 0,5 µg de proteína/poço. A MN foi cortada em tiras contendo cada uma dois poços sensibilizados com antígeno. Os sítios livres de ligação de proteínas presentes foram bloqueados pela adição do tampão (PBS com 2% de caseína) por 60 minutos. Colocaram-se as tiras de MN em tubos de ensaio contendo soro teste diluído em PBS-T (1:50) por 60 minutos. Distribuiu-se o conjugado diluído 1:500 em PBS-T, por 90 minutos. Revelou-se a MN numa solução de DAB/4-Chloronapthtol (solução A- 12 mg de Diaminobenzidine (3,3'-Diaminobenzidine (DAB) – Sigma. Cat. N° D 5637) em 12 mL de PBS, solução B- 5 mg de 4-Chloronapthtol (Sigma. Cat. N° C 8890) adicionado a 2 mL de metanol e 10 mL de PBS. Entre cada etapa foram realizadas 4 lavagens com PBS-T (PBS mais tween 20 a 0,5%). Misturou-se as duas soluções A e B e acrescentou-se 10 µL de H₂O₂ a 30% por 15 minutos, ao abrigo da luz. Na leitura foram considerados positivos todos aqueles soros que desenvolveram uma reação de cor, fraca ou forte. O soro negativo não desenvolveu cor.

ELISA indireto (Elisa-i)

Foram utilizadas microplacas flexíveis, de polivinil, de 96 poços, de alta capacidade de adsorção (Microtest III – Falcon / USA. Cat. N° 3912). A sensibilização das placas foi realizada com 0,5 mg de antígeno em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) incubadas por 4 horas a 37 °C. Após a

incubação lavou-se duas vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%, 0,05% de Tween 20). Bloqueou-se os sítios livres com tampão (PBS 2% de caseína) a 37 °C em câmara úmida, por 60 minutos. Em seguida as placas foram lavadas por duas vezes. Foram distribuídos na placa, 100 mL dos soros teste, em duplicata, e dos soros padrão positivo e negativo (em quadruplicata), diluídos 1:50 em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20), onde permaneceram por 60 minutos à 37 °C, em câmara úmida. Após a lavagem (seis vezes) distribuiu-se 100 µL do conjugado anti-IgG caprina marcado com peroxidase na diluição (1:1500) em tampão de incubação e manteve-se por 60 minutos à 37 °C, em câmara úmida. Lavou-se novamente as placas por seis vezes e as reações foram reveladas pela adição de 100 µL do substrato, uma solução de 0,2 mg/mL de s-phenylenediamine (OPD) (Sigma. Cat. N° P 9029) e 0,02% (v/v) de H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (0,1 M, pH 5,0), por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi parada com 20 µL de H₂SO₄ (diluído 1:20). A intensidade da cor da reação foi determinada por absorbância em espectrofotômetro (Multiskan – MS, Labsystems) em 492 nm de comprimento de onda.

IDGA

Foi utilizada a microtécnica de IDGA descrita por Gouveia et al. (2000) realizada em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30 µl de soro/antígeno (Ag) comercial, derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus ovino contendo as proteínas: glicoproteína 135 (envoltório viral) e proteína estrutural p27 (capsídeo). A leitura foi realizada 48-72 horas após, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura.

Soro caprino

Na padronização do ponto de corte do ELISA-i foram selecionados 56 soros de caprinos de dois rebanhos sem raça definida, negativos para detecção de anticorpos para LVC pelo IDGA, oriundos da região tradicionalmente caracterizada pela criação extensiva. Para a comparação dos testes foram utilizados amostras do Banco de Soros do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária - UFMG (273 soros) e de duas fazendas do estado do Ceará (54 soros).

Validação do Dot-Blot

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos nos testes de IDGA, ELISA-i e DB. Foram avaliados sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e negativo, e eficiência. Os resultados dos testes foram comparados através do teste de qui-quadrado com correção de Yates (c²)

(Tyler e Cullor, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos testes.

Resultados

O Ag produzido para o DB e ELISA-i apresentou uma concentração protéica de 2,2 mg/mL. Testou-se este Ag na IDGA contra o soro padrão anti-MVV/CAEV e o mesmo apresentou duas linhas de difícil visualização o que inviabilizou a utilização deste na IDGA. Na avaliação da concentração protéica do Ag comercial para IDGA verificou-se a quantidade de 12,95 mg/mL. A padronização do DB foi realizada através de uma série de simulações variando a quantidade de proteína de Ag por poço, o bloqueio, bem como as diluições de soro e do conjugado. A diluição do soro que apresentou melhores resultados foi de 1:50 e a menor quantidade de Ag que apresentou uma boa visualização foi de 0,5 µg de proteína. A padronização da diluição do conjugado utilizou as diluições de 1:300, 1:500, 1:700 e 1:1000 frente a quatro concentrações de antígeno/poço: 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg e 0,125 µg. Foi observado que a diluição do conjugado de 1:500 apresentou melhor resultado com menos reações inespecíficas frente ao soro negativo e que a concentração de 0,5 µg de antígeno apresentou boa visualização frente ao soro positivo.

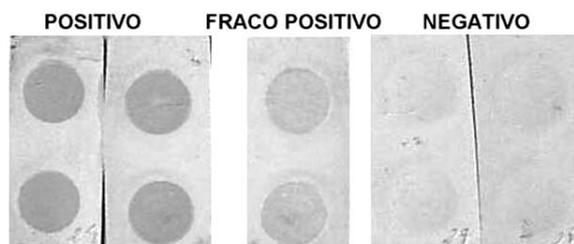
Na análise das soluções de bloqueio: PBS + leite em pó desnatado 3% (LPD); PBS + caseína 2% e PBS/Tween20 0,3% com as MN sensibilizadas com 0,5 µg de proteína e diluição do soro e conjugado de 1:50 e 1:500, respectivamente, verificou-se que todos as três apresentaram bons resultados, entretanto a solução de bloqueio que apresentou menores reações inespecíficas do soro negativo foi o bloqueio de caseína 2%.

Na Figura 1 consta o resultado da padronização do teste de DB. A MN sensibilizada com 0,5 µg de proteína do antígeno foi bloqueada com uma solução de PBS/Caseína 2% e adicionados pool de soros positivos, fraco positivos e de soros negativos, testados pela MIDGA, numa diluição de 1:50.

Os soros positivos apresentaram no DB uma resolução caracterizada pela cor forte e indicando no sistema uma reação específica antígeno-anticorpo.

O ELISA-i foi padronizado no sentido de se obter diferença máxima entre as densidades óticas (DO) de soros negativos e positivos. Para determinação do ponto de corte utilizou-se a média da percentagem da DO de 56 soros de animais negativos pelo IDGA, oriundos de rebanhos seguramente isentos do LVC, mais três desvios padrões. De acordo com estes critérios chegou-se ao resultado de 11,72%. Estes 56 soros foram testados também pelo DB e apresentaram resultados negativos.

Como controle negativo verificaram as reações imunogênicas dos soros positivos e negativos (diluição de 1:50) frente a um controle celular não infectado.



Quantidade de antígeno - 0,5 µg/poço
 Diluição do conjugado - 1:500
 Diluição do soro - 1:50

Figura 1 - Resultado final do Dot-Blot para o diagnóstico de LVC de um pool de soros positivo, fraco positivo e negativo

Todos os resultados do DB, utilizando soros positivos e negativos, foram negativos nas várias concentrações de proteína, de 0,016 µg a 2,0 µg, do cultivo de células de MSC, indicando que as proteínas das células da MSC não influenciaram os resultados.

Verificou-se que o ELISA-i detectou 209 caprinos positivos, o DB detectou 200, enquanto a IDGA detectou 144 animais de 327 soros analisados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultado do teste de soros de caprinos pelo IDGA, ELISA-i e Dot-Blot para o diagnóstico de anticorpos contra LVPR

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA AgK	144	44,04	183	55,96	327
Dot-Blot	200	61,16	127	38,84	327
Elisa-i*	209	63,91	118	36,09	327

* Positivo (DO > 11,72% em relação ao padrão positivo (pp))
 Negativo (DO < 11,72% do pp)

Tabela 2 - Comparação dos resultados de soros caprinos testados pelo Dot-Blot e pelo ELISA-i para a detecção de anticorpos contra LVPR

		Elisa-i*		Total
		Pos	Neg	
Dot-Blot	Pos	191	9	200
	Neg	18	109	127
	Total	209	118	327

*Positivo (DO > 11,7% em relação ao padrão positivo)
 Negativo (DO < 11,7% do pp)

Presumindo o ELISA-i como o teste referência, a comparação com o DB revelou concordância de 90,2% ($p < 0,001$) no teste de 327 amostras de soros de caprinos. Diante destes resultados (Tabela 2) verifica-se

Tabela 3 - Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), eficiência (Efic), índice Kappa e qui-quadrado (c^2) para IDGA e Dot-Blot em relação ao ELISA-i de 327 amostras de soro caprino

Teste	Sens	Espec	VPP	VPN	Efic	Kappa	c^2 *
IDGA	65,6	94,1	95,1	60,7	75,8	0,53	138,16 ($p < 0,001$)
Dot-Blot	91,4	92,4	95,5	85,8	91,7	0,83	102,53 ($p < 0,001$)

*Qui-quadrado com correção de Yates

que o DB é um teste com ótima sensibilidade e uma boa especificidade. A especificidade não apresentou resultados melhores aparentemente em decorrência de problemas na classificação dos verdadeiros negativos, pois considerando-se o grupo de animais nativos de fazendas tradicionais do Ceará estes foram negativos no DB, com 100% de concordância entre os testes. Segundo a classificação do índice Kappa (Thrusfield, 1995) o DB apresentou uma excelente concordância com o ELISA-i (Kappa > 0,8).

Discussão

O teste sorológico inicialmente utilizado no diagnóstico de LVPR (Crawford e Adams, 1981) e ainda largamente utilizado, é a IDGA (Knowles, 1997). Este teste é recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico sorológico de infecção por LVPR (OIE, 1996) e é utilizado em programas de controle da infecção (Knowles, 1997, Gouveia et al., 2000;). A IDGA apresenta reação antigênica cruzada entre isolados de LVC e lentivírus ovino (LVO) envolvendo todas as principais proteínas virais. Tanto os soros caprinos com anticorpos contra CAEV precipitam todas as proteínas do vírus da Maedi-Visna (MVV), como os soros ovinos com anticorpos contra MVV precipitam as proteínas do CAEV (Gogolewski et al., 1985). Devido a esta reação cruzada e por estar mais disponível no mercado, em decorrência de uma maior produção (Cutlip et al., 1977), o antígeno aplicado neste trabalho foi produzido com MVV e contém as principais proteínas do gene env e gag, a glicoproteína gp135 e a core proteína p28, e os soros padrões. Convém salientar, que se o antígeno fosse produzido com LVC a sensibilidade do teste seria provavelmente maior em até 35% devido ao uso de antígeno homólogo (Knowles et al., 1994).

A importância da escolha de um antígeno influencia marcadamente os resultados da IDGA no diagnóstico das enfermidades causadas pelos LVPR. A utilização de um antígeno com as duas proteínas (gp 135 e p28) aumentam a sensibilidade. Comparando pela IDGA dois antígenos da CAEV produzidos com as proteínas gp135 e p28, Adams e Gorham (1986) verificaram que o antígeno gp135 detectava um maior número de animais positivos que o antígeno p28, entretanto, existiam animais que apresentavam somente anticorpos contra a p28. Com o objetivo de observarem como a

expressão de anticorpos varia durante o tempo em caprinos soropositivos, Hanson et al. (1996), utilizando a IDGA com antígenos gp135 e p28 do lentivírus MVV, verificaram que a expressão de anticorpos para CAEV variou ao longo do tempo, mostrando que reações soropositivas e soronegativas podem ocorrer intermitentemente. Baseado nestes fatos ressalta-se a necessidade da utilização conjunta das proteínas nos antígenos para aumentar a sensibilidade da prova.

Parte da validação de um teste sorológico deve incluir a sensibilidade e especificidade. O ideal seria realizar comparação dos resultados do teste com o verdadeiro status de infecção do animal, definido por algum sistema de teste biologicamente independente (não sorológico). Infelizmente o status de infecção do animal é raramente conhecido, especialmente na CAE em virtude da patogenia da enfermidade (Heckert et al., 1992). Knowles (1997) sugere a imunoprecipitação e o immunoblotting como referência para a comparação dos testes como critério independente e seguro de classificação da população de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Entretanto, no caso do immunoblotting pode ocorrer desnaturação de proteínas virais com alteração dos epitopos, principalmente nas glicoproteínas, durante a eletroforese (SDS-PAGE) verificada no LVC (Johnson et al., 1983, Zanoni et al., 1989) e/ou durante a transferência das proteínas do gel de poliácridamida para membrana de nitrocelulose (Johnson et al., 1983), o que reduz a sensibilidade deste teste. A imunoprecipitação é um teste muito caro, laborioso e quase impraticável para a realização de grande quantidade de testes. Em decorrência destes fatores utilizou-se, neste trabalho a sensibilidade e especificidade com base nos resultados dos próprios testes.

O antígeno produzido utilizou o vírus completo e foi usado tanto para o teste ELISA-i como para o DB. Sua concentração foi compatível com a observada por Castro (1998). Zanoni et al. (1989) relataram que a utilização do vírus completo como fonte de proteínas antigênicas apresenta vantagens em reduzir resultados falso-positivos. Este antígeno quando testado no IDGA contra o soro padrão anti-MVV/CAEV verificou-se a presença de duas linhas de difícil visualização o que inviabilizou a utilização deste antígeno na IDGA. Observação semelhante foi constatada por Abreu (1996) com o antígeno precipitado por polietilenoglicol (PEG) através de metodologia similar. Provavelmente durante a purificação das proteínas a conformação destas, necessária no teste de IDGA, pode ter sido alterada. Entretanto, Castro (1998) verificou a presença de duas fortes linhas de precipitação.

A quantidade maior de proteína encontrada no Ag comercial (12,98 mg/mL) em comparação com o Ag produzido para o ensaio imunoenzimático (2,2 mg/mL) foi verificada em decorrência da metodologia utilizada. Na produção do antígeno comercial para o IDGA foi utilizado uma metodologia que concentra o

antígeno juntamente com as proteínas encontradas no sobrenadante, principalmente soro fetal bovino, utilizado para o crescimento celular. Enquanto que na elaboração do antígeno do Dot-Blot as proteínas virais foram purificadas através da ultracentrifugação em colchão de sacarose.

Testou-se no ELISA os reagentes do kit comercial e verificou-se que o soro reagente do Kit, abundante em anticorpos contra a gp135, ficou abaixo do ponto de corte, enquanto, o soro positivo, rico em gp135 e p28 foi altamente positivo. Baseado nisto, pode-se inferir que o ELISA-i, apesar de ser produzido com o vírus total, provavelmente, não possui quantidade de gp135 suficiente para a sua detecção. O principal componente do antígeno deste ELISA-i é a proteína p28. Corroborando com este achado, Celer Jr. et al. (1998) verificaram, por immunoblotting, que a proteína gp135 só foi evidente em soros fortemente positivos e que o antígeno utilizado no ELISA produzido tinha como principal componente a p28. Torfason et al. (1992) relatam que alguns antígenos, especialmente as glicoproteínas, são sensíveis ao tratamento sofrido na purificação por ultracentrifugação em colchão de sacarose. Relatam, também, que no início dos testes immunoblotting e ELISA comerciais para o diagnóstico do lentivírus humano (HIV) os glicopolipeptídeos eram pobremente expressados, provavelmente devido a perda destes durante a preparação. Em virtude da similaridade antigênica entre os LVPR, explicada pela seqüência de nucleotídeos conservada da região gag, que codifica os determinantes antigênicos grupo-específico da p28 (Roberson et al., 1982), existem variações nucleotídicas que podem influenciar os resultados de testes sorológicos. A sensibilidade e a confiança dos testes sorológicos não dependem somente do tipo do teste utilizado, mas pode ser influenciado pelo método de preparação do antígeno usado no diagnóstico, na escolha da cepa viral, e dos componentes virais do antígeno mais relevantes imunologicamente (Celer Jr. et al., 1998). Na análise de dados de soroprevalência, além destes fatores, deve-se levar em conta que, existem animais que mesmo infectados não podem ser diagnosticados sorologicamente em decorrência da soroconversão tardia, variação no títulos de anticorpos para LVPR durante a vida do animal (Hanson et al., 1996), heterogeneidade genética das cepas virais (Rosati et al., 1995), latência sorológica (Perk, 1999) e anergia.

O DB utilizando o antígeno com o vírus completo da amostra CAEV Cork foi superior ao teste IDGA e comparável ao ELISA-i. O protocolo desenvolvido apresentou boa resolução e reação inespecífica baixa, além, de um bom rendimento, utilizou-se somente 0,5 µg de antígeno e uma diluição de 1:500 de conjugado.

Em conclusão, o teste DB utilizando antígeno com o vírus completo mostrou ser um bom teste para o diagnóstico da LVC para avaliar, com praticidade, grande número de animais. Portanto o DB é um teste

mais viável que a IDGA e o ELISA indireto para utilização no controle desta infecção, pois além de ser mais sensível que a IDGA, não necessita da indumentária tecnológica do ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e conseqüentemente mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões, etc).

Bibliografia

- Abreu FT (1996). Isolamento de um vírus sincicial caprino (amostra RPE-03) e comparação da sensibilidade e especificidade relativas do antígeno Maedi-Visna frente ao antígeno AEC (amostra Cork) em teste de IDGA. 45p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Adams DS, Gorham JR (1986). The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, 40(2): 157-160.
- Adams DS, Oliver RE, Ameghino E, DeMartim JC, Verwoerd DW, Houwers DJ, Waghela S, Gorham JR, Hyllseth B, Dawson M, Trigo FJ, McGitire TC (1984). Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Rec.*, 115: 493-495.
- Castro RS (1998). Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filo-genéticas. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 1998. 132p. Tese (Doutorado).
- Celer Jr V, Celer V, Němcová H, Zanoni RG, Peterhans, E (1998). Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *J. Vet. Med. B.*, 45: 183-188.
- Crawford TB, Adams DS (1981). Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178(7): 713-719.
- Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA, Weaver AL (1977). Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, 33: 1081-1084.
- Gogolewski RP, Adams DS, McGuire TC, Banks KL, Cheevers WP (1985). Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glicoproteins. *J. Gen. Virol.*, 66: 1233-1240.
- Gouveia AMG, Melo LM, Pires LL, Pinheiro RR (2000). Microimunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes. In: Congresso Brasileiro de Med. Veterinária, 27, Águas de Lindóia-São Paulo. Anais. Águas de Lindóia: p. 33.
- Greenwood PL (1995). Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, 22: 71-87.
- Hanson J, Hydbring E, Olsson K (1996). A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Vet. Scand.*, 37(1): 31-39.
- Heckert RA, McNab WB, Richardson SM, Biscoe MR (1992). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Can. J. Vet. Res.*, 56: 237-241.
- Houwers DJ, Gielkens ALJ, Jan Schaake Jr J (1982). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. *Vet. Microbiol.*, v.7: 209-219.
- Hurn BAL, Chantler SM (1980). Production of reagent antibodies. *Methods enzymol.*, 70: 104-142.
- Johnson GC, Barbet AF, Klevjer-Anderson P, McGuire TC (1983). Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infect. Immun.*, 41(2): 657-665.
- Knowles DP (1997). Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, 13: 1-11.
- Knowles DP, Evermann JF, Shropshire C, Van der Schalie J, Bradway D, Gezon HM, Cheevers, W P (1994). Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of anti-body to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microb.*, 32(1): 243-245.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 2655-2755.
- McKinney MM, Parkinson A (1987). A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluid. *J. Immunol. Methods*, 96: 271-278.
- Nakane PK, Kawoi A (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 22: 1084-1091.
- Office International des Epizooties, (1996). Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. World Organization for Animal Health. 369-373.
- Perk K (1999). Concealed locations of lentivirus in Caprine Arthritis Encephalitis System. (1999). *Virology*, 253: 8-9.
- Reed LJ, Muench H (1938). A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hygiene*, 27: 493-497.
- Reis JKP, Leite RC (1994). An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. *Prev. Vet. Med.*, 20: 261-267.
- Roberson SM, McGuire TC, Klevjer-Anderson P, Gorham JR, Cheevers WP (1982). Caprine arthritis-encephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *J. Virol.* 44(2): 755-758.
- Rosati S, Pittau M, Tolari F, Erre G, Kwang J (1995). Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet. Microbiol.*, 45(4): 363-370.
- Rowe JD, East NE (1997). Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, 13(1): 35-53.
- Stott DI (1989). Immunoblotting and dot blotting. *J. Immun. Met.*, 119: 153-187.
- Thrusfield MV (1995). *Veterinary Epidemiology*. 2aEd. Blackwell Science, 479p.
- Torfason EG, Gudnadóttor M, Love A (1992). Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of Visna-Maedi. *Arch. Virol.*, v. 123: 47-58.
- Tyler JW, Cullor JS (1989). Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 194(11): 1550-1558.
- Zanoni R, Kreig A, Peterhans E (1989). Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 580-582.