

DIAGNÓSTICO PRECOCE DE DOENÇAS E SUA IMPORTÂNCIA NA PRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS

Raymundo Rizaldo Pinheiro¹

Francisco Selmo Fernandes Alves¹

Alice Andrioli¹

SUMÁRIO

As enfermidades infecciosas e parasitárias determinam grandes prejuízos à caprino e ovinocultura e indiretamente à saúde pública. Uma das ferramentas disponíveis para a amenizar este problema seria o diagnóstico precoce que tem como objetivo disponibilizar resultados com maior rapidez, segurança e praticidade. O diagnóstico precoce na área epidemiológica pode ser traduzido por uma constante análise dos dados da vigilância sanitária e baseados nestes, na implantação de medidas que evitem uma disseminação de uma ou várias enfermidades, bem como na montagem de programas de controle, erradicação, dentre outras. Com relação aos métodos laboratoriais, atualmente diversas técnicas imunológicas e de biologia molecular podem ser aplicadas para obtenção de uma resposta rápida, prática e segura e, portanto, realizar um diagnóstico precoce. A estabilidade dos sistemas produtivos sustentável passa pelo uso adequado de tecnologias, manejos eficientes e detecção precoce de problemas. A caprino e ovinocultura no Nordeste, é um exemplo deste, pois através do seu crescimento e modernização, favorece um desenvolvimento mais harmônico, socialmente justo e sustentável.

INTRODUÇÃO

Na produção de caprinos e ovinos o sucesso do empreendimento depende de vários fatores, entre os quais figuram, com destaque, as práticas sanitárias. Estas, quando organizadas em um sistema de informações, fornecem os elementos essenciais acerca da diversidade e magnitude dos problemas de saúde prevalentes na região, podendo contribuir para as reais necessidades da produção, quer seja leite, carne e pele.

É patente a impossibilidade de quantificação da ocorrência de doenças em populações sem que se disponha de um sistema adequado para sua identificação, o qual se apoia, essencialmente, em dois componentes fundamentais:

- Existência de recursos operacionais configurados numa política nacional e regional de saúde dotada de toda estrutura institucional (oficial e particular) com profissionais treinados e capacitados;
- Disponibilidade de métodos de diagnósticos confiáveis, práticos, rápidos e de baixo custo.

Vale salientar que qualquer que seja a natureza da enfermidade, todo o processo para seu tratamento, controle e/ou erradicação, se inicia com o diagnóstico. Entretanto, o diagnóstico não constitui um fim em si mesmo, se não, numa etapa fundamental que

¹ Med. Vet. PhD - Embrapa Caprinos

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

desencadeia uma série de ações. O diagnóstico tem grande importância epidemiológica em um rebanho ou região produtora, pois possibilita o planejamento de atividades multidisciplinares e institucionais no sentido de traçar medidas de controle e/ou prevenção das doenças. No animal, individualmente, um diagnóstico precoce conduz normalmente a um tratamento rápido e eficaz.

IMPACTO DAS ENFERMIDADES NO SISTEMA DE PRODUÇÃO DE CAPRINO E OVINOS

As enfermidades infecciosas e parasitárias determinam grandes prejuízos à caprino e ovinocultura e indiretamente à saúde pública. Como exemplo, apresenta-se os custos necessários para o tratamento de algumas enfermidades de pequenos ruminantes (Tabela 1). Por exemplo, A Artrite Encefalite Caprina (CAE) foi introduzida, no Brasil, a partir de 1978, através da importação de animais, para melhoramento leiteiro e hoje, encontra-se disseminada por todas as regiões (mais de 14 estados já constataram o problema com prevalência variando entre 3 a 49%) causando sérias perdas nesta atividade produtiva. Outra enfermidade em evidência é a Febre Aftosa que constitui uma forte barreira sanitária e comercial para a exportação. Várias outras enfermidades também causam perdas econômicas nesta atividade, tais como: Linfadenite Caseosa, Helmintoses, Eimeriose, Clostridioses, dentre outras.

Tabela 1 - Estimativa do custo de tratamentos, de algumas das principais enfermidades de pequenos ruminantes, por animal.

Enfermidades	Discriminação	Valor (US\$)	Valor (R\$)
Linfadenite Caseosa	1. Medicamentos	1,44	3,30
	2. Mão-de-obra ¹	0,08	0,19
	Total	1,52	3,49
Pododermatite	1. Medicamentos	1,19	2,73
	2. Mão-de-obra ²	0,71	1,64
	Total	1,90	4,37
Ectima contagioso	1. Medicamentos	0,12	0,27
	2. Mão-de-obra ³	0,21	0,47
	Total	0,32	0,74
Ceratoconjuntivite	1. Medicamentos	1,82	4,19
	2. Mão-de-obra ⁴	0,41	0,93
	Total	2,23	5,12
Eimeriose	1. Medicamentos	5,61	12,91
	2. Mão-de-obra ⁵	0,61	1,39
	Total	8,11	14,30
Ectoparasitas	1. Medicamentos	0,03	0,06
	2. Mão-de-obra ⁶	0,14	0,31
	Total	0,16	0,37
Mastite	1. Medicamentos	3,24	7,44
	2. Mão-de-obra ⁷	0,51	1,16
	Total	3,74	8,60

Fonte: EMBRAPA Caprinos.

* Valor em dolar (junho de 1999) atualizado para real (abril de 2002)

1. Drenagem do material caseoso e troca do dreno após 24 horas.
2. Considerando a média de peso vivo = 30 kg/animal (15 min./dia x 7 dias)
3. Aplicação de iodo: 5 min./aplicação x 2 vezes/dia x 3 dias = 30 minutos
4. Medicamento - 2 vezes/dia x 6 dias = 60 minutos
5. Medicamento- (2 vezes/dia x 7 dias) (30 min./dia x 3 dias) = 90 minutos
6. Pulverização 10 min./animal x 2 banhos = 20 minutos
7. Ordenha + aplicação de compressa quente: 15 min./dia x 5 dias = 75 minutos

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

Segundo Silva (1996), que analisou o sistema agro-industrial da caprinocultura leiteira no Brasil, observou, o problema sanitário de maior relevância ainda é a verminose, seguida da artrite encefalite caprina (CAE).

Na tabela 2, num levantamento realizado em 127 propriedades no Estado do Ceará, principalmente de caprinos mestiços ou SRD, observam-se, conforme informações dos proprietários, as enfermidades e sinais clínicos que acometem os rebanhos caprinos. Um estudo semelhante foi realizado no semi-árido mineiro (Tabela 3), em rebanhos caprino e ovino compostos principalmente pelo tipo racial SRD e mestiços.

Tabela 2- Enfermidades e sinais clínicos que acometem os rebanhos caprinos no Estado do Ceará, 2001.

Enfermidades & Sinais Clínicos	Presença		Ausência		Não sabe informar	
	Número	%	Número	%	Número	%
Helmintoses	104	81,9	19	15,0	4	3,2
Diarréia	100	78,7	24	18,9	3	2,7
Aborto	96	75,6	26	20,5	5	3,9
Pododermatite	86	67,7	35	27,6	6	4,7
Linfadenite Caseosa	85	66,9	37	29,1	5	3,9
Ectoparasitoses	81	63,8	42	33,1	4	3,2
Mamite	65	51,2	56	44,1	6	4,7
Pneumonia	57	44,9	65	51,2	5	3,9
Ectima contagioso	42	33,1	80	63,0	5	3,9
Ceratoconjuntivite	37	29,1	85	67,0	5	3,9
Sintomatologia Nervosa	33	26,0	89	70,1	5	3,9
Malformação fetal	19	1,0	103	81,1	5	3,9
Criptorquidismo	14	11,0	108	85,0	5	3,9
Prolapso de vagina/útero	14	11,0	108	85,0	5	3,9
Artrite	11	8,7	110	86,6	6	4,7
Febre aftosa	3	2,4	119	93,7	5	3,9
Raiva	1	0,8	121	95,3	5	3,9

Fonte: Pinheiro (2001).

Tabela 3- Enfermidades e sinais clínicos nos rebanhos pesquisados no norte de Minas Gerais, 2001.

Enfermidades /Sinais Clínicos	Presença	
	Número	%
Linfadenite Caseosa	100	47,9
Aborto	86	41,2
Ectoparasitoses	63	30,0
Diarréias	56	26,8
Ectima Contagioso	44	21,0
Mamite	33	15,8
Ceratoconjuntivite	31	15,8
Pododermatite	26	12,4
Pneumonia	26	12,4

Fonte: Gouveia et al. (2002) – Comunicação verbal.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das doenças em animais pode ser realizado através de dois procedimentos: o método clínico e o método epidemiológico. As etapas nos dois métodos são muito semelhantes. O método clínico aplica-se no indivíduo, enquanto, o método epidemiológico mais abrangente, se aplica a um rebanho ou uma região produtiva indicando as possíveis causas e fatores de risco envolvidos no problema e suas medidas de controle. Na tabela 4 estão relacionados as características de cada método.

Tabela 4 – Características dos métodos de diagnóstico

Etapas	Características dos Métodos de Diagnóstico	
	Clínico	Epidemiológico
Base da informação	Animal doente ou são	Rebanho doente ou são
Coleta de informações	Anamnese e dados individuais	Dados da área afetada da ambiência
Tipo de exame	Exame físico geral e especial	Inspeção da área em geral e particular a determinados serviços
Hipótese	Diagnóstico clínico	Hipótese epidemiológica
Medidas temporárias	Tratamento inicial	Recomendações gerais
Laboratório	Exame de amostras corporais (Sangue, urina, etc)	Exame de água, alimentos e outras amostras
Diagnóstico	Diagnóstico definitivo	Diagnóstico epidemiológico
Medidas definitivas	Tratamento definitivo	Medidas de controle
Registro da ação efetuada	História clínica	Ficha epidemiológica; Informe

Fonte: Côrtes (1993).

Os métodos de diagnóstico laboratoriais tiveram o seu início no século XIX através dos estudos de Pasteur com testes de aglutinação e evoluíram com os avanços da imunologia e da biologia. Atualmente, um dos maiores desafios da ciência moderna e da medicina veterinária é a aplicação dos avanços básicos da imunobiologia, imunquímica e da biologia molecular no diagnóstico e procedimentos terapêuticos úteis.

Nas duas últimas décadas, as técnicas laboratoriais na área de imunologia e biologia tem tornado-se cada vez mais refinadas, precisas e simples. Por causa da sua inerente sensibilidade e especificidade, estes métodos tem agora um papel central nos modernos laboratórios de ciência.

O diagnóstico precoce tem como objetivo em medicina veterinária melhorar a disponibilidade, acurácia e precisão, além de disponibilizar resultados com maior rapidez, assegurando uma correta interpretação.

DIAGNÓSTICO PRECOCE

O diagnóstico precoce refere-se a detecção do problema ou de uma enfermidade o mais rápido possível, podendo utilizar ferramentas clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Num diagnóstico precoce ideal caracteriza-se por ser: rápido, prático, seguro, baixo custo, apresentar alta sensibilidade e especificidade e necessitar de poucos equipamentos e infraestrutura.

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

As vantagens do diagnóstico precoce são: rapidez, fácil leitura e resultado, segurança e controle mais eficiente das enfermidades. Enquanto que as suas desvantagens, são: Geralmente mais caro, necessita freqüentemente de equipamento, área laboratorial e de pessoal qualificado e treinado.

A importância do diagnóstico precoce para os pequenos ruminantes é ressaltada pelo reconhecimento de animais do rebanho antes da fase clínica da enfermidade, retirada rápida de animais enfermos do rebanho, menor número de animais exposto a contaminação, redução dos gastos com tratamentos, redução dos gastos com sacrifício e abate de animais, redução das perdas com produção (carne/leite/pele), controle mais eficiente das enfermidades, incremento na exportação de produtos, barreira sanitária mais eficiente e facilitar o manejo sanitário.

O diagnóstico precoce pode ser utilizado quando é necessária uma resposta e ação rápida e efetiva, tais como: importação de animais ou material biológico que ficarão em quarentena, Vigilância Sanitária – trânsito de animais no país, fases avançadas de programas de controle de enfermidade, programas de erradicação de enfermidades e diagnóstico de enfermidade de animais de alto valor genético.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PRECOCE

O diagnóstico precoce na área epidemiológica pode ser traduzido por uma constante análise dos dados da vigilância sanitária e baseados nestes na implantação de medidas que evitem uma disseminação de uma ou várias enfermidades, bem como na montagem de programas de controle, erradicação, dentre outras.

Com relação aos métodos laboratoriais, atualmente diversas técnicas imunológicas e de biologia molecular podem ser aplicadas para obtenção de uma resposta rápida, prática e segura e, portanto, realizar um diagnóstico precoce. Algumas técnicas mais importantes para o diagnóstico das principais enfermidades dos pequenos ruminantes são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Técnicas de diagnóstico precoce das principais enfermidades dos pequenos ruminantes, no Brasil.

<u>Enfermidades</u>	<u>Testes padronizados</u>
<u>Brucelose</u>	<u>ELISA¹, PCR¹</u>
<u>CAE</u>	<u>ELISA², Dot Blot², PCR³, Imunofluorescência²</u>
<u>Febre Aftosa</u>	<u>ELISA⁴, PCR⁴</u>
<u>Linfadenite Caseosa</u>	<u>ELISA⁵, Dot Blot⁶</u>
<u>Língua Azul</u>	<u>ELISA⁷, PCR⁷</u>
<u>Micoplasmose</u>	<u>PCR⁸, Imunofluorescência⁸, ELISA⁹</u>
<u>Raiva</u>	<u>ELISA¹⁰, PCR¹¹, Dot Blot¹²</u>
<u>Toxoplasmose</u>	<u>ELISA¹³, PCR¹³</u>

- 1- Bastuji (2000)
- 2- Pinheiro et al. (2001)
- 3- Andrioli (2001)
- 4- Reid et al. (1998)
- 5- Alves (1988)

- 6- Vaiseh (1990)
- 7- Billinis et al. (2001)
- 8- Bajmocy et al. (2000)
- 9- Thiaucourt et al. (1996)
- 10- Esterhuysen et al. (1995)

- 11- Ito et al. (2001)
- 12- Jayakumar et al. (1996)
- 13- Esteban et al. (1998)

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

Dentre os métodos de diagnóstico laboratorial precoce destacam-se os:

MÉTODOS DIRETO

Estes métodos detectam o próprio agente (bactérias, vírus, fungos, parasitas, dentre outros) ou fragmentos do seu material nucléico (DNA ou RNA).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

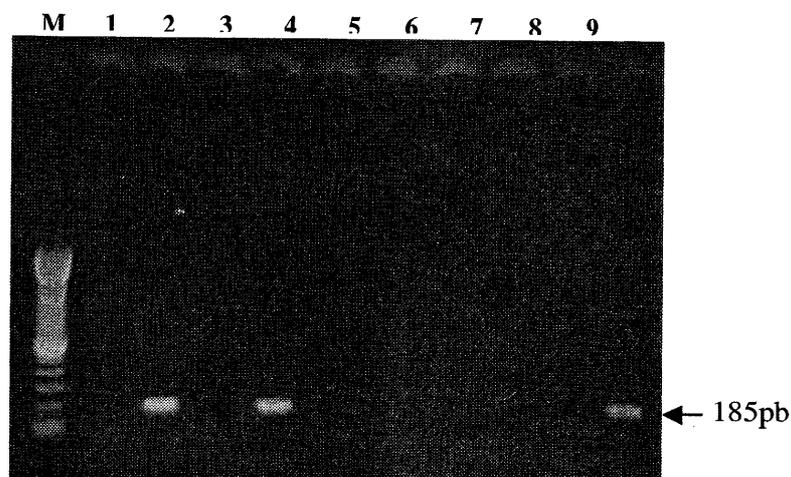
Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80. Esta técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA presentes no material analisado, amplificando-o em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob estado de latência, integrados ao genoma do hospedeiro, ou, ainda, microrganismos mortos, podem ser detectados por este método. A amplificação *in vitro* dos ácidos nucléicos permite a obtenção de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA. Desta forma, a PCR vem sendo adotada mundialmente na pesquisa de microrganismos devido à sensibilidade, especificidade e rapidez de seus resultados. É possível detectar o DNA proviral de vírus um dia após a infecção dos cultivos celulares, e de apenas uma célula infectada em um cultivo de 10⁶ células, sendo a técnica mais eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença.

Existem vários tipos de PCR, tais como: PCR *Nested*, PCR *duplo-Nested*, RT-PCR, dentre outros.

A PCR *Nested* ou PCR *duplo Nested* aumenta a sensibilidade quando comparada à PCR simples, enquanto que a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos. Porém, estas técnicas são mais caras e trabalhosas, além de apresentar, no caso da PCR *Nested* grande risco de contaminação do laboratório com DNA amplificado levando a ocorrência de falsos positivos. Quanto ao RT-PCR esta técnica é utilizada, principalmente, para a detecção de enfermidades causadas por vírus RNA.

A técnica da PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA-proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras como: sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite, tecidos, sêmen, fluidos uterinos e embrião (Figura 4). No caso especificamente dos lentivírus dos pequenos ruminantes (LVPR), é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso. Porém, parece não haver relação entre o título de anticorpos e o aparecimento de bandas positivas à PCR no sangue e nem todas as amostras positivas aos testes sorológicos que são também positivas na PCR.

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários



Fonte: Andrioli, 2001.

Figura 4 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase – PCR *Nested* de amostras de fluido uterino de cabras infectadas com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M – marcador DNA Ladder; 2 e 4 - amostras positivas; 1, 3, 5, 6, 7 e 8 – amostras negativas; 9 – controle negativo e 10 - controle positivo.

A PCR poderá ser utilizada em programas de erradicação para identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que esta técnica seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos.

Hibridização *in situ* (HIS)

Esta técnica é muito sensível e consiste na identificação de segmentos específicos de ácido nucléico, encontrados em tecidos ou células infectados, capazes de serem detectados por sondas de DNA marcadas por enzimas ou por radioatividade. É de uso limitado, em decorrência de ser laboriosa e dispendiosa para ser utilizada em rotina de diagnóstico, entretanto pode ser utilizada para dirimir resultados duvidosos.

Ensaio Imunoenzimático (ELISA, Imunohistoquímica, dentre outros)

Os testes imunoenzimáticos para detecção de antígenos são, também, formas de diagnóstico direto do agente. Estes testes, necessitam de anticorpos marcados com enzimas contra os agentes causais, o que muitas vezes exigem anticorpos monoclonais, específico para cada agente infeccioso.

MÉTODOS INDIRETOS

Os métodos de diagnóstico indireto se caracterizam pela detecção de anticorpo anti o agente causal. A sorologia para detecção de enfermidades é uma forma funcional de diagnóstico, podendo ser realizada através de técnicas como: imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto, *Dot-Blot* e *immunoblotting*. Na Tabela 6 encontra-se a sensibilidade relativa de vários ensaios.

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

Tabela 6- Sensibilidade relativa de ensaios para antígenos e anticorpos

Técnica	Sensibilidade aproximada(/DL)
Dosagem de proteína (Biureto / refratometria)	100 mg
Imunoelektroforese	5-10 mg
Imunofixação	5-10 mg
Imunodifusão simples	< 1-2 mg
IDGA	< 1 mg
Contra-imunoelektroforese	< 100 µg
Fixação de complemento	1 µg
Aglutinação	1 µg
Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI)	1 µg
Ensaio imunoenzimático (ELISA)	< 1 µg
<i>Dot-Blot</i>	< 1 µg
ELISA com sistema de amplificação (Biotina/avidina e Quiluminescência)	< 1pg
Imunofluorescência	< 1pg
Radioimunoensaio	< 1pg

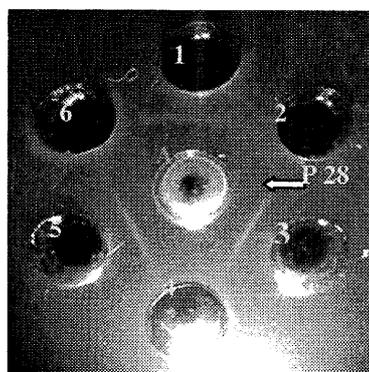
Fonte: Stites et al. (1995) – modificado

Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA)

Devido à praticidade na coleta das amostras e ao baixo custo/benefício, a detecção de anticorpos, é amplamente utilizada, sendo a IDGA recomendada para o diagnóstico inicial num rebanho ou região onde seja desconhecida a prevalência de enfermidades. Este teste é recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico de infecção por lentiviruses de pequenos ruminantes (LVPR). O teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony fundamenta-se na difusão de anticorpo e antígeno em uma base semi-sólida contendo ágar e eletrólitos. Quando antígeno e anticorpo se encontram em concentrações equivalentes, interagem e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação

O teste de microimunodifusão (MIDGA), reduz o custo por diminui comparativamente a quantidade de antígeno necessário no teste. O MIDGA mais utilizado é o hexagonal por apresentar melhores resultados, dado que a amostra de soro a ser testada fica posicionada entre dois padrões positivos, facilitando a leitura do resultado.

No caso dos LVPR, as proteínas gp 135(glicoproteína) e p28(proteína nuclear) (Figura 5 e 6) são as responsáveis pelas linhas de precipitação observadas no teste de IDGA, sendo que o antígeno gp 135 detecta maior número de caprinos infectados do que o antígeno p28, ainda que alguns animais desenvolvam resposta anti-p28 na ausência de resposta anti-gp 135. Salienta-se, portanto, a importância da escolha dos soros de referência utilizados em testes IDGA, para diagnóstico de infecção por LVPR.



Fonte: Pinheiro et al. (2001).

Figura 5 – MIDGA realizado com antígeno (Ag) de CAEV com a proteína p28. Os poços 1, 3 e 5 possuíam soro reagente. O poço 2 soro positivo, o poço 4 soro negativo e o poço 6 soro fraco positivo.

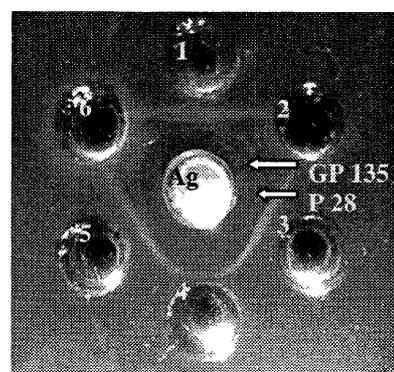
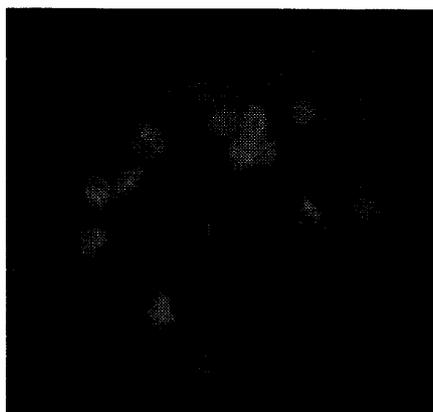


Figura 6 - MIDGA realizado com antígeno (Ag) de CAEV com as proteínas p28 e gp 135. Os poços 1, 3 e 5 possuíam soro reagente para as duas proteínas. Os poços 2 e 6 soro negativo para p28 e positivo para gp 135. O poço 4 soro positivo para as duas proteínas.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As reações de imunofluorescência indireta possibilitam a visualização da interação antígeno/anticorpo, através de uma anti-imunoglobulina com fluorocromos. Estas substâncias são capazes de absorverem energia luminosa tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo. Tais substâncias passam a liberar tal energia na forma de fluorescência (Figura 7). Os fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina (fluorescência vermelha) e o isotiocianato de fluoresceína (fluorescência verde).



Fonte: Pinheiro et al. (2001)

Figura 7 – Imunofluorescência indireta de soro positivo para LVPR (400x).

Esta técnica pode ser usada para detectar e titular anticorpos, como também, identificar e localizar antígenos. Comparando os testes RIFI, IDGA e ELISA, na pesquisa de anticorpos contra o Lentivírus ovino – vírus da Maedi-Visna (MVV), verificaram que o a RIFI e a IDGA apresentaram concordância de 94%. Utilizada como referência em outras retrovirose, tais como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a RIFI chega a 100% de concordância entre o ELISA e *Immunoblotting*. É, também considerada como uma técnica de eleição para o diagnóstico da toxoplasmose.

Apesar da técnica apresentar uma boa sensibilidade e ser relativamente de baixo custo, é necessário um treinamento específico do técnico, principalmente com relação à leitura dos resultados.

Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI)

Este teste é uma das provas de rotina para detecção de anticorpos contra a toxina da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Linfadenite Caseosa). É um teste que através da inibição ou não da hemólise em placa de petri contendo toxina do *Rhodococcus equi* pode-se determinar a quantidade de anticorpos contra o agente. É uma prova de custo relativo, aplicabilidade, sensibilidade e especificidade. Apresenta sensibilidade e especificidade compatível em parte com o ELISA e o *Dot-Blot*.

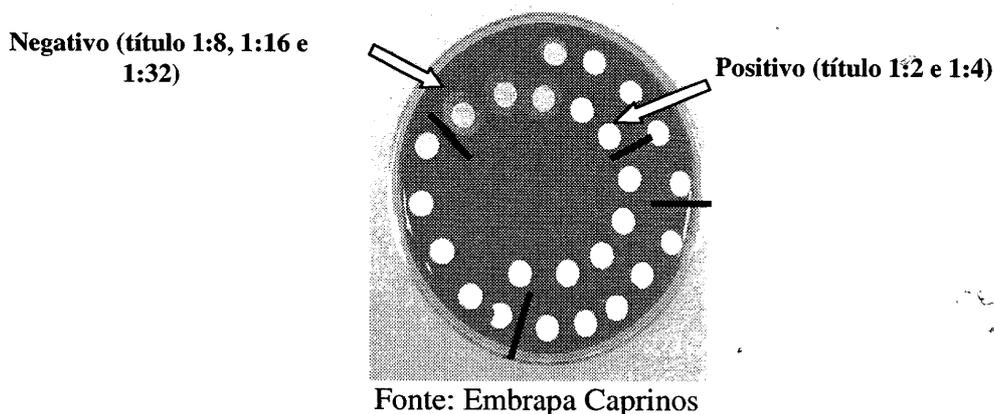
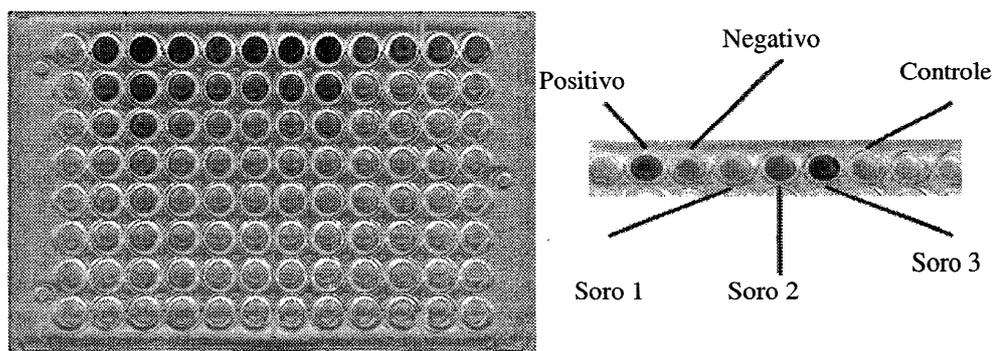


Figura 8 – Teste de Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI) em cinco amostras de soro ovino em cinco diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) se baseia na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividade tanto imunológica como enzimática. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e insolubilizado sobre um suporte (placa), a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e poderá, facilmente, ser revelada mediante a adição de um substrato específico que, sob ação da enzima, produzirá uma cor vista a olho nu e quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro (Figura 8).



Fonte: Pinheiro et al. (2001).

Figura 8 – Placa de ELISA com resultados positivos e negativos para LVPR.

Diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para as enfermidades de pequenos ruminantes, onde são empregados tanto antígenos naturais como recombinantes. De acordo com o antígeno e a técnica do ELISA empregados (direto, indireto, sanduíche de competição, etc) existe uma grande variação de sensibilidade e especificidade. Apesar disto, esta técnica, de uma maneira geral, apresenta boa sensibilidade e mantém alta a especificidade. Sendo, portanto, indicada na utilização de diagnóstico precoce, programas de controle e de erradicação de enfermidades.

Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-immunoblotting)

O *Dot-immunoblotting* (DB) pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras; ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. As amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose coberta com anticorpos e analisadas por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada como um método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do immunoblotting após a transferência do antígeno para a membrana.

No diagnóstico da CAE, o DB é um teste com boa resolução e baixa reação inespecífica sendo mais viável que a IDGA e o ELISA indireto para utilização no controle desta enfermidade, pois além de ser mais sensível que a IDGA, não necessita da instrumentação tecnológica do ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e, conseqüentemente, mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões, etc) ou, até mesmo, no campo.

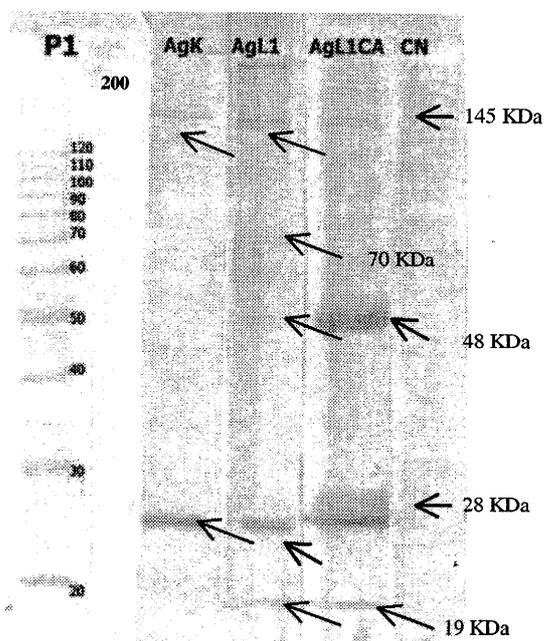


Fonte: Pinheiro et al. (2001)

Figura 9 - *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico de CAE de um *pool* de soros positivos, fracos positivos e negativos, testados pelo IDGA.

Immunoblotting ou Western blotting

Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa vem sendo utilizada somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas antigênicas, mas com o desenvolvimento de novos aparelhos que multiplicam a quantidade de testes (*immunoblotting*) realizados será mais um método de diagnóstico precoce de altíssima sensibilidade. Na sua execução, o material protéico viral é separado por eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Na membrana, o complexo antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação. O *immunoblotting* detecta anticorpos dependendo da infecção já aos 4 dias pós-infecção, enquanto no ELISA indireto os anticorpos são detectados 15 a 20 dias pós infecção. Comprova-se, assim, a alta sensibilidade do *immunoblotting* para detecção precoce de anticorpos para o vírus da CAE. É considerado como teste de excelência.



Fonte: Pinheiro et al. (2001)

Figura 10 – *Immunoblotting* de soro positivo para LVPR testado em vários antígenos (Ag): Ag comercial (AgK), antígeno nacional concentrado (AgL₁) e antígeno nacional purificado por afinidade em coluna anti-LVPR (AgL₁CA) e confrontado com padrão de peso molecular (P1) e controle negativo (produzido a partir de células de membrana sinovial de caprino não infectada – CN).

Com relação ao custo de cada prova Reischak (2000) verificou que o teste de imunofluorescência indireta (US\$ 1,72) é mais barato que o IDGA (US\$ 2,48) entretanto o autor não detalha o custo. Pinheiro (2001) com uma análise detalhada dos custos de produção do antígeno e dos testes verificou que o teste MIDGA custava US\$ 0,67 enquanto que o *Dot Blot* era US\$ 1,00 e o ELISA US\$ 1,22. Provavelmente a diferença do custo entre os dois autores possa ser explicada em parte devido a variação da quantidade de material utilizada entre as duas técnicas (IDGA X MIDGA).

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

PERSPECTIVAS - Marcadores moleculares para detecção de genótipos resistentes à enfermidades

As novas técnicas de biotecnologia aliada às metodologias tradicionais deverão aumentar ainda mais a produção animal que vem sendo observado com os pequenos ruminantes. O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permite que animais mais resistentes às enfermidades infecciosas e aos distúrbios metabólicos se tornem mais produtivos e precoces.

É interessante lembrar que os animais da mesma espécie possuem o mesmo grupo de genes, ou seja, as informações para síntese de proteína, produção de anticorpos, hormônios, dentre outros. Porque, então, há diferenças em resistência a doença entre animais da mesma espécie? Essas diferenças são resultantes de pequenas alterações que ocorrem nas seqüências de nucleotídeos (DNA), que constituem a informação genética do animal.

Atualmente o estudo de marcadores moleculares para detecção de enfermidades esta mais desenvolvido na espécie bovina, entretanto, é uma ferramenta importante que pode ser utilizada para associar genes/marcadores à característica de resistência a helmintos, dentre outras enfermidades. Trabalhos de pesquisa têm demonstrado a associação entre polimorfismo genético e resistência a helmintos em ovinos. Ressalta-se que até o momento não existem estudos de marcadores genéticos associados à resistência a infecção parasitária em caprinos.

Portanto, num futuro próximo, o uso de marcadores moleculares para selecionar pequenos ruminantes resistentes às enfermidades possibilitará um incremento substancial na produção destas espécies.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços nos métodos de prevenção e controle das enfermidades demandam pesquisas nas áreas tecnológicas e científicas em medicina veterinária. Em consequência desses avanços no processo de produção e melhoria na sanidade animal, cita-se o diagnóstico precoce, que auxilia a obtenção de animais mais saudáveis, produtos de qualidade e incremento na pauta de exportação.

A estabilidade dos sistemas produtivos sustentável passa pelo uso adequado de tecnologias, manejos eficientes e detecção precoce de problemas. A caprino-ovino cultura no Nordeste, é um exemplo deste, pois através do seu crescimento e modernização, favorece um desenvolvimento mais harmônico, socialmente justo e sustentável.

BIBLIOGRÁFICA CONSULTADA

- ALVES, F. S. F. *Immunokinetics of goats with C. ovis vaccination and infection*. Davis: University of California, 1988. 68p. Thesis (Master of Science).
- ANDRIOLI, A. *Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões*. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 2001. 68p. Tese (Doutorado).
- BASTUJI, B. G. Brucellosis in sheep and goat - advances in diagnosis, prevention and control. In: International Conference on Goats, 7, France, 2000. *Proceedings*. France, INRA, p. 267-272, 2000.

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002

III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira

VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

- BAJMOCY, E., TURCSANYI, I., BOLSKE G., BACŠADI, A., KISS, I. Disease caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* LC in Hungary goat herds. *Acta Vet Hung.*, v. 48, n. 3, p: 277-283, 2000.
- BILLINIS C., KOUMBATI M, SPYROU, V., NOMIKOU, K. MANGANA, O., PANAGIOTIDIS, C. A., PAPADOPOULOS, O. Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription-PCR: a comparasion with conventional methods. *J. Virol. Methods*, v. 98, n. 1, p: 77-89, 2001.
- CÔRTEZ, J.A. *Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais*. São Paulo: Varela, 1988. 227p.
- ESTEBAN-REDONDO, I., INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. *Int. J. Parasitol.*, n. 28, v.9, p.1459-1466, 1998.
- ESTERHUYSEN, J. J., PREHAUD, C., THOMSON, G. R. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. *J. Virol. Methods*, v. 51, n. 1, p.31-42, 1995.
- JAYAKUMAR, R., THIRUMURUGAN, G., NACHIMUTHU, K., PADMANABAN, V. D. Detection of rabies virus antigen in animals by avidin-biotin dot ELISA. *Zentralbl. Bakteriol.* v. 285, n. 1, p.82-85, 1996.
- ITO, M., ITOU, T., SAKAI, T., SANTOS, M. F., ARAI, Y.T., TAKASAKI, T., KURANE, I., ITO, F.H. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.*, v.63, n. 12, p. 1309-1313, 2001.
- KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, p.1-11, 1997.
- MADRUGA, C. R., ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Brasília: Embrapa, 2001. 360p.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. World Organization for Animal Health. p. 369-373, 1996.
- PINHEIRO, R. R. VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA: *Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará*. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 2001. 115p. Tese (Doutorado).
- PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G. *Métodos de diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes*. Sobral – CE, Embrapa Caprinos, 2001. (Embrapa Caprinos, Circular Técnica, 24).
- REISCHAK, D. *Lentivírus de pequenos ruminantes: imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos e caprinos*. Porto Alegre: UFRGS – Faculdade de veterinária, 2000. 132p. Dissertação (Mestrado).
- REID, S. M., FORSYTH, M. A., HUTCHING, G. H., FERRIS, N. P. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods*, v. 70, n. 2, p: 213-217, 1998.
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa, 2001. 215p.
- RIBEIRO, L.A.O. Risco de introdução de doenças exóticas pela importação de ovinos. *Bol. Lab. Reg. Diagn. –UFPEL.*, v13 p.39-44, 1993.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. London: Mosby, 5ª ed. 1998. 422p.

VI Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE 2002
III Semana da Caprino-Ovinocultura Brasileira
VI Feira de Produtos e de Serviços Agropecuários

- SILVA, R. R. *Sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil*. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1996. 38p. (Monografia, Especialização em Agribusiness).
- STITES, D. P.; STOBO, J.D.; WELLS, J.V. *Basic & Clinical Immunology*. 6.ed. Lange medical book, 1995. 412p.
- THIAUCOURT, F., BOLSKE, G., LENEGUERSH, B., SMITH, D., WESONGA, H. Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia. *Rev. Sci. Tech.* V.15, n.4, p. 1415-1429, 1996.
- VAISEH, F. P. *Development of a Dot Blot assay for sero-diagnosis of caseous lymphadenitis using a purified exotoxin as antigen*. Davis: University of California, 1990. Tesis (PhD).