

ENSAIO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO UTILIZADOS NA DETECÇÃO DO LENTIVÍRUS CAPRINO

Kelma Costa de Souza¹, Alice Andrioli Pinheiro², Raimundo Rizaldo Pinheiro³, Roberta Lemonte de Brito³. ¹Bolsista FUNCAP, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa Caprinos, e-mail: Kelma_zoo@hotmail.com; ²Orientadora, Pesquisadora Doutora e colaboradora do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa Caprinos. e-mail: alice@cnpc.embrapa.br; ³Pesquisador Doutor e colaborador do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa Caprinos. e-mail: rizaldo@cnpc.embrapa.br, ⁴Bolsista FUNCAP, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa Caprinos, e-mail: rolomrnt@gmail.com.

Resumo: A artrite encefalite caprina (CAE) é uma importante infecção em caprinos, causada por retrovírus da subfamília Lentiviridae. Esta doença é persistente, progressiva e debilitante. Uma das medidas de controle desta patologia consiste na separação entre os animais sadios dos portadores, porém como os animais portadores podem não manifestar sinais clínicos, torna-se necessário o auxílio de testes laboratoriais que permitam seu diagnóstico (Abreu *et al.*, 1998). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio da detecção de anticorpos (Ac) no soro, isolamento viral e a detecção do DNA proviral pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os principais testes sorológicos empregados para detecção são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), ELISA e “Imuno Western Blot” (Rutkosk *et al.*, 2001). O objetivo do presente trabalho foi de avaliar e comparar dois métodos de diagnóstico do LVC indiretos (IDGA, Western Blot) e um direto com uso da biologia molecular (PCR). 166 fêmeas SRD, foram submetidas ao diagnóstico de rotina (IDGA) para a detecção de anticorpos contra o LVC em associação com Western Blot. Destes, 44 animais foram submetidos aos testes de PCR. A comparação dos ensaios PCR/IDGA e PCR/Western Blot não apresentaram diferença significativa ($p > 0,001$), mas no ensaio IDGA/Western Blot houve diferença significativa ($p < 0,001$), indicando que os testes apresentam diferença quanto a sensibilidade. Dos três testes o IDGA mostrou-se o menos sensível.

Palavras-chave: artrite encefalite caprina, lentivírus, métodos de diagnóstico

ASSAY OF THE USED MÉTODOS OF DIAGNOSIS IN THE DETECÇÃO OF LENTIVÍRUS CAPRINE

Abstract: The arthritis encephalitis caprine (CAE) is an important infection in goat, caused for retrovírus of the subfamily Lentivirinae. This illness is persistent, gradual and debilitating. One of measurements as of controls of this patologia consists at the breakup among the animals healthy of the carrier, we shall place like the animals carrier can not to manifest check marks clinical, may necessary to make tests laboratoriais than it is to she'll permit your own diagnosis (Abreu *et al.*, 1998). The laboratorial diagnosis can be carried through by means of the detention of antibodies (Ac) in the serum, viral isolation and the detention of the proviral DNA for the Reaction in Chain of Polimerase (PCR). The chief tests sorológicos employees about to detection they are the one imunodifusão well into gel as of capture (IDGA), ELISA e “Imuno Western Blot” (Rutkosk *et al.*, 2001). 166 females SRD, had been submitted to the diagnosis of routine (IDGA) for the detention of antibodies against the LVC in associação with Western Blot. Of these, 44 animals had been submitted to the PCR tests. The balance of the assays PCR / IDGA and PCR / Western Blot did not they presented difference significativa ($p < 0,001$), but at the assay IDGA / Western Blot there had been difference significativa ($p < 0,001$), indicating as the tests they present difference as for delicacy.

Keywords: arthritis encaphalitis caprine, lentivírus, methods of diagnosis

Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma importante infecção em caprinos, causada por retrovírus da subfamília Lentiviridae. Esta doença é persistente, progressiva e debilitante. O reservatório e a fonte de infecção são os animais infectados, de ambos os sexos, de várias raças e idades. A CAE se caracteriza por causar artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (Cork *et al.*, 1974). A forma mais importante da doença é a artrítica, que geralmente é observada em animais com mais de cinco meses de idade (Crawford e Adams, 1981). Uma das medidas de controle desta patologia consiste na separação entre os animais sadios dos portadores, e pelas características da doença e por não existirem sinais clínicos, torna-se necessário o auxílio de testes laboratoriais que permitam seu diagnóstico (Abreu *et al.*, 1998). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio da detecção de anticorpos (Ac) no soro, isolamento viral, e detecção do DNA proviral pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Os principais testes sorológicos empregados para detecção são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), ELISA e “Imuno Western Blot” (Rutkosk *et al.*, 2001). O IDGA é recomendado pela OIE (*Oficce International dès Epizooties*), por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas, tendo grande aceitação na execução de testes de rotina em rebanhos, devido ao custo relativamente baixo, à boa sensibilidade e especificidade, além da praticidade de execução e leitura (Harkiss e Watt, 1990). Outros métodos mais específicos e mais sensíveis como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Andrioli, 2001), têm sido utilizados, principalmente em estudos experimentais, já que o seu custo e complexidade limitam o seu uso rotineiramente. A PCR é particularmente importante para a

identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso (Rimstad *et al.*, 1993). Embora a PCR identifique animais portadores do LVC antes da soroconversão, tem-se relatado que após a soroconversão a PCR é menos sensível quando comparada aos testes sorológicos, de forma que há a recomendação que se utilize a associação de pelo menos dois testes num programa de controle (De Andrés *et al.*, 2005). O objetivo do presente trabalho foi de avaliar e comparar dois métodos de diagnóstico do LVC indiretos (IDGA, Western Blot) e um direto com uso da biologia molecular (PCR).

Metodologia

O experimento foi conduzido na Embrapa Caprinos localizada no município de Sobral região norte do Estado do Ceará. As coletas de sangue por venopuntura da jugular foram realizadas com tubos vacuntainer de 5ml com EDTA e 10ml sem anticoagulante para a separação do soro. A avaliação laboratorial dos animais foi realizada na patologia clínica e no laboratório de biologia molecular da unidade. Durante um período de dois anos foram acompanhadas 166 fêmeas SRD, com testes de rotina para a artrite encefalite caprina o IDGA em associação com Western Blot. Destes, 44 animais foram também submetidos aos testes de PCR. As classificações de positividade e negatividade, foram assim analisadas, no IDGA pela visualização de linhas de precipitação indicativa a presença de anticorpos específicos para LVC, sendo que as amostras seriam classificadas como positivas (formação de linha de identidade entre o soro controle positivo e a amostra em teste em relação ao antígeno), negativas (não formação de linha de identidade). No Western Blot, por revelação da Membrana de Nitrocelulose (MN) numa solução de DAB/4-choronaphthol (solução A-12mg de Diaminobenzidine em 12ml de PBS, solução B-5MG de 4-choronaphthol adicionado a 2ml de metanol mais 10ml de PBS, misturando as duas soluções e acrescentando 10 μ l de H₂O₂ a 30%) por 10 a 15 minutos ao abrigo da luz. Após a revelação as MN são comparadas ao controle positivo e negativo. E na PCR, pela leitura do gel de agarose a 1% corado com brometo de etidíó e visualização sobre o transiluminador (luz ultravioleta) para a iluminação das bandas de leitura, através da comparação com os marcadores moleculares, controles negativo e positivo. As análises estatísticas foram realizadas pelo método do Qui-quadrado, com valor estabelecido de $p < 0,001$ com correção de Yates.

Resultados e Discussão

Dos 44 animais que foram submetidos aos testes de PCR e IDGA, 41 e 44 apresentaram resultados negativos para o LVC nos dois testes, respectivamente, três positivo na PCR e zero no IDGA não apresentando diferença significativa ($p > 0,001$) entre os testes. Dos 41 animais que foram submetidos aos testes de PCR e Western Blot, 38 e 39 apresentaram resultados negativos para o LVC, respectivamente, três positivos na PCR e dois no Western Blot, não apresentando diferença significativa ($p > 0,001$) entre os testes. Na comparação dos testes de IDGA e Western Blot, dos 166 soros testados 24 foram positivos no Western Blot e todos foram negativos no IDGA, com significância estatística ($p < 0,001$) (tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos métodos de diagnóstico IDGA e Western Blot

IDGA	Western Blot	Resultados
0	24*	Positivo
166	142	Negativo
166	166	Total

* Diferença estatisticamente significante. Teste do qui-quadrado com correção de Yates resultando em valor de $p < 0,001$.

Conclusões

1. O teste IDGA mostrou-se o menos sensível, embora seja o mais utilizado pela facilidade de execução;
2. O Western Blot apresentou sensibilidade relativa bem maior que o IDGA, podendo ser indicado para utilização do controle da CAE;
3. A PCR também apresentou uma sensibilidade maior que o IDGA, sendo indicado para a detecção de animais falso negativos às provas sorológicas;
4. A escolha do teste de diagnóstico, assim como o uso concomitante de diferentes testes, têm implicação direta no sucesso dos programas de controle da CAE.

Referências Bibliográficas

ABREU, S.R.O.; ROBERTO, S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, n.2, p.57-60, 1998.

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. (2001). 68 f.. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CORK, L.C.; HADLON, W.J.; CRAWFORD, T.B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. **The Journal Infectious Disease**, v.129, n. 2, p.134-141, 1974.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **Journal of the American Veterinary Medical Association**., v.178. p.713-719. 1981.

DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v.25. n.107, p.49-62. 2005.

HARKISS, G.D.; WATT, N.J. Lentivirus infections and their detection. **Goat Vet. Soc. J.** v 11(1),p.19-25, 1990.

RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; De ROCK, E.; PEDERSEN, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. . **American Journal of Veterinary Research**., v.54, p.1858-62, 1993.

RUTKOSKI, J.K.; WERENICZ, R.; REISCHAK, D.; WENDELSTEIN, A.C.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia de polimerase com “primers” degenerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**., v.53, n.6, p.635-640, 2001.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standarts for diagnostic tests and vaccines**.World Organization for Animal Health. p.369-373, 1996.