



Comparação de dois testes sorológicos na evolução da infecção natural de caprinos leiteiros com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina – dados preliminares¹

Apoliana de Sousa Rodrigues², Roberta Lomonte Lemos de Brito³, Vanderlan Warlington Souza dos Santos⁴, Ronaldo Pereira Dias², Ismênia França de Brito⁵, Alice Andrioli⁶, Raymundo Rizaldo Pinheiro⁷

¹ Estudo financiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP, Governo de Estado do Ceará.

² Bióloga (o), Bolsista de Apoio Técnico em Extensão no País – CNPq, e-mail: pollyrodrigues@hotmail.com; ronaldodias01@yahoo.com.br

³ Msc. Bolsista Desenvolvimento Tecnológico Industrial – CNPq, e-mail: rllbrito@veterinaria.med.br

⁴ Graduando em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA. Bolsista FUNCAP, e-mail: vanderlansouza@zootecnista.com.br

⁵ Graduanda em Zootecnia da UVA. Bolsista CNPq, e-mail: ismenia_franca@hotmail.com

⁶ Dra. Pesquisadora Embrapa Caprinos e Ovinos, e-mail: alice@cnpce.embrapa.br

⁷ Orientador, Pesquisador Dr. Embrapa Caprinos e Ovinos e professor do curso de zootecnia da UVA, e-mail: rizaldo@cnpce.embrapa.br

Resumo: Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade que se apresenta de forma contínua, incurável e têm como sintomas clínicos a mastite, artrite, pneumonia e leucoencefalomielite. Objetivou-se com este estudo uma avaliação sorológica, empregando dois métodos indiretos: a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e o *Western Blot* (WB), na infecção natural com o vírus da CAE. Foram realizadas coletas de sangue através da punção da veia jugular, em 100 matrizes caprinas ½ Anglo-Nubiana x ½ Saanen, provenientes de rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE. Os sangues foram centrifugados a 1500 xg por 15 minutos, armazenados em tubo tipo eppendorf e congelados a -20 °C até a realização das provas sorológicas. As análises estatísticas foram realizadas pelo Qui-quadrado e pelo teste de exato de Fisher. Os testes sorológicos foram repetidos a cada quatro meses, totalizando três avaliações sorológicas. Nestas verificou-se uma maior detecção de animais soropositivos pelo WB com relação ao IDGA ($p < 0,05$). Ressalta-se que algumas cabras que apresentaram resultado negativo no IDGA foram ao longo do tempo seroconvertendo, confirmando os resultados observados no WB. Com este estudo, concluiu-se que o *Western Blot* é mais sensível que o IDGA, pois detectou mais precocemente a presença de anticorpos contra o vírus. Isto ressalta a importância deste teste como uma ferramenta para identificação de animais soropositivos.

Palavras chave: CAEV, enfermidade, IDGA, *Western Blot*

Comparison of two serological tests in the evolution of natural infection of dairy goats with the Caprine Arthritis-Encephalitis Virus - data preliminaries

Abstract: Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) is a disease incurable and has clinical symptoms: mastitis, arthritis, pneumonia and leucoencephalomyelitis. The aim of this study was evaluate serologically, animals naturally infected with CAE virus, using two indirect methods: Agar Gel Immunodifusion (AGID) and Western Blot (WB). Were collected the blood through the jugular vein in one hundred goats, ½ Anglo-Nubian x ½ Saanen, of the herd belongs to Embrapa Goats and Sheep, Sobral, CE. The bloods were centrifuged to 1500g for 15 minutes, stored in Eppendorf tube and frozen at -4 °F until the accomplishment of serological tests. The statistical analysis was performed by chi-square test and Fisher exact test. Serologic tests were repeated every four months, totaling three evaluations. The detection of the positive animals was more by WB than AGID ($p < 0.05$). Pointed out that some goats that presented negative result in the IDGA were along the time seroconverted, confirming the results observed in the WB. With this study, it was conclude that Western Blot is more sensitive than IDGA, because it detected precocious as the presence of antibodies against the virus. This highlights the importance of this test as a tool for identification of positive animals.

Keywords: AGID, CAEV, disease, Western Blot

Introdução

Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade que se apresenta de forma contínua, incurável e têm como sintomas clínicos a mastite, artrite, pneumonia, emagrecimento crônico e leucoencefalomielite. O reconhecimento internacional da CAE como uma virose ocorreu em 1980, classificado como um lentivírus da família Retroviridae, denominado “Caprine Arthritis-Encephalitis Virus” (Narayan et al., 1980). Este vírus tem distribuição mundial e foi introduzido no Brasil no final da década de 70 após a importação de caprinos para melhorar o plantel nacional (Pinheiro et al., 2006). O vírus da CAE (CAEV) possui características complexas e infecta células do sistema monocítico-fagocitário de caprinos de qualquer raça, sexo e faixa etária (Cork et al., 1974). Diversas técnicas sorológicas têm sido utilizadas, para saber a prevalência do vírus, no Ceará a soropositividade encontrada variou de 1% a 40,73% (Melo & Franke, 1997; Pinheiro et al., 1999; Pinheiro et al., 2001). O diagnóstico da CAE pode ser realizado através de técnicas indiretas ou diretas. Dentre as técnicas indiretas tem-se o teste de Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) e o *Western Blot* (WB). O IDGA é o teste recomendado pela Organização Internacional de Epizootias e apresenta resultados rápidos. Possui um custo relativamente baixo quando comparado ao WB. Sendo este um teste mais preciso, porque consegue obter melhores resultados sem apresentar muita variação de erros. Seu princípio consiste na separação das proteínas virais, através da técnica de eletroforese, transferência para uma membrana e realização de uma reação

imunoenzimática (Pinheiro et al., 2006). Objetivou-se com este estudo uma avaliação sorológica, empregando dois métodos indiretos: o IDGA e o *Western Blot*, na infecção natural com o vírus da CAE.

Material e Métodos

O experimento foi realizado, na Embrapa Caprinos e Ovinos, situada em Sobral-CE. Foram realizadas coletas de sangue através da punção da veia jugular, com tubo tipo vacutainer® de 10mL sem anticoagulante, em 100 matrizes caprinas ½ Anglo-Nubiana x ½ Saanen. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica da Embrapa onde foram centrifugadas a 1500g por 15 minutos, armazenadas em tubo tipo eppendorf e congeladas a -20 °C até a realização das provas sorológicas de IDGA e *Western Blot* (WB). Os testes sorológicos foram repetidos a cada quatro meses, por duas vezes. Para a realização dos testes seguiu-se o protocolo descrito por Pinheiro et al (2006), com antígeno produzido pela Embrapa Caprinos e Ovinos com cepa padrão CAEV Cork, o qual foi clarificado por centrifugação, a uma velocidade de 3895 xg, a 4°C, por 20 minutos. No IDGA o antígeno foi concentrado no sistema Amicon e para WB foi ultracentrifugado em colchão de sacarose. Após a ultracentrifugação as proteínas do vírus foram dosadas pelo método de Bradford. Foi feita eletroforese em gel SDS-PAGE a 12,5% e após a separação das bandas de proteínas, estas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com PBS Tween (PBS-T) a 0,3%, por 60min, em seguida lavada por 5min com PBS-T a 0,05% e repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. A diluição utilizada para o primeiro anticorpo foi de 1:50 e para o segundo de 1:18000. O tempo de incubação foi de 30 e 60 minutos, respectivamente. A revelação foi feita com diaminobenzidine (DAB), 4-cloro-naftol e peróxido de hidrogênio. Para o IDGA, o gel foi preparado após a adição de 6,0g de NaCl e 1,0 de agarose em 100 mL de PBS. Após preparo, o gel foi resfriado e distribuído sobre lâminas de vidro, em seguida armazenado em câmara fria. No dia seguinte o gel foi perfurado com uma roseta e utilizou um soro positivo padrão, as amostras a serem testados e o antígeno. A leitura foi feita após 48 a 72 horas. Sendo última leitura considerada definitiva. As análises estatísticas foram realizadas pelo Qui-quadrado (χ^2) e pelo teste de exato de Fisher, utilizando-se o programa Epi Info versão 3.5.1.

Resultados e Discussão

No IDGA foram observadas linhas de precipitação em frente aos poços com amostras positivas para o CAEV. As linhas são formadas quando o anticorpo e o antígeno se encontram em iguais concentrações, após esta ligação, se precipitam formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como bandas de precipitação (Roitt et al., 1998).

As bandas de proteínas do vírus presentes no gel SDS-PAGE a 12,5% foram medidas e apresentaram os pesos moleculares: 14; 22; 26; 29; 33; 36; 39; 43; 55; 67; 79; 86; 95; 103; 115; 127; 135 e 142 KDa. Porém após a transferência e a reação imunoenzimática somente algumas proteínas foram evidenciadas, dentre elas as proteínas de 14 KDa, 29 KDa; 43 KDa e a 67KDa. A banda protéica mais visível foi da proteína do capsídeo viral cujo o peso molecular variou de 28 a 29 KDa e representa o maior componente estrutural do núcleo (Zee & Hirsh, 2003), sendo a proteína de base para a interpretação do IDGA e do WB.

Nas avaliações sorológicas verificou-se uma maior detecção de animais soropositivos pelo WB com relação ao IDGA em todos os testes sorológicos ($p < 0,05$) (Figura 1).

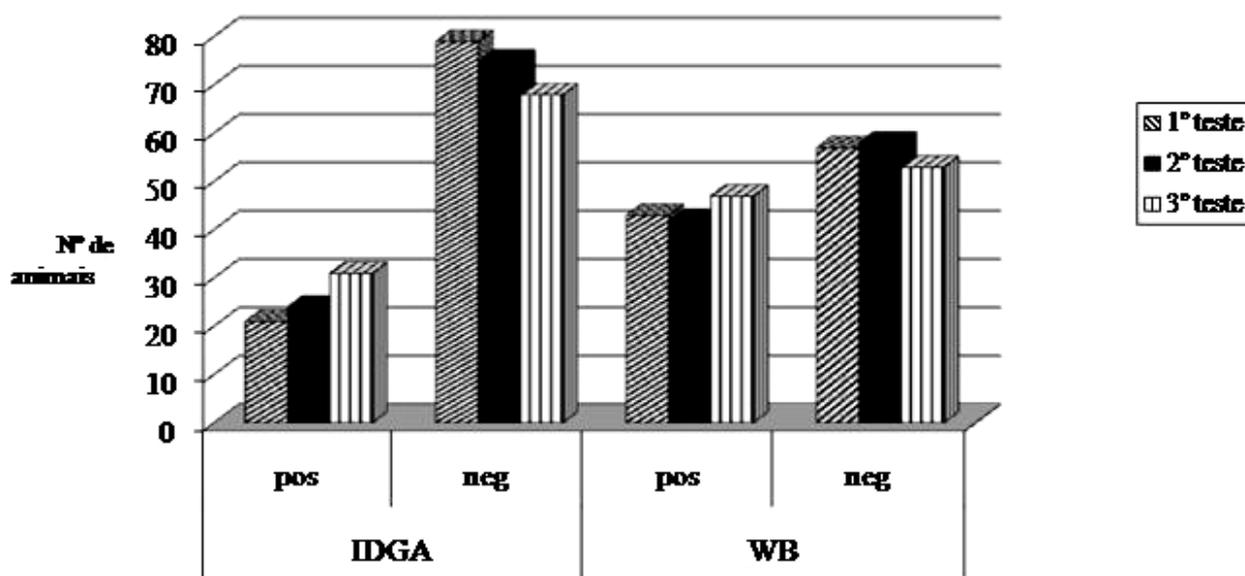


Figura 1. Gráfico comparando os testes de Imunodifusão em Gel de Agarose e o Western Blot.

Foi possível observar que algumas cabras que apresentaram resultado negativo no IDGA foram ao longo do tempo soroconvertendo e confirmando os resultados observados no WB. Mesmo usando um teste mais sensível (WB) não foi possível determinar todos os animais positivos no primeiro teste, pois, possivelmente, alguns destes deveriam ser recém-infectados e, portanto, ainda não expressando um número de anticorpo detectável. Desta forma, verificou-se ao longo do tempo uma soroconversão em ambos os testes, no IDGA, de 10 animais (21 para 31 soropositivos) o que corresponde a uma taxa de soroconversão de 47,61%, enquanto no WB, observou-se uma taxa inferior, de 9,3% (de 43 para 47 animais soropositivos) (Tabela 1).

Tabela 1. Soropositividade para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina encontrada em cabras ½ Anglo-nubiana x ½ Saanen, utilizando-se o IDGA e o WB.

CAEV		Testes sorológicos		χ^2	Valor de P	Razão de chances	Intervalo de confiança 95%
		IDGA	WB				
1º teste sorológico	Soronegativo	79	57	10,13	0,01	0,35	0,18 – 0,69
	Soropositivo	21	43				
2º teste sorológico	Soronegativo	75	58	5,75	0,02	0,46	0,24 – 0,88
	Soropositivo	25	42				
3º teste sorológico	Soronegativo	69	53	4,73	0,03	0,51	0,27 – 0,94
	Soropositivo	31	47				

Esses resultados demonstram que o WB é mais sensível que o IDGA, por detectar mais precocemente anticorpos contra CAEV.

Conclusões

Com este estudo concluiu-se que o *Western Blot* é mais sensível que o IDGA, pois detectou mais precocemente a presença de anticorpos contra o vírus. Isto ressalta a importância deste teste como uma ferramenta para identificação de animais soropositivos.

Agradecimentos

À Embrapa Caprinos e Ovinos por ter fornecido as condições necessárias para realização do estudo, ao Banco do Nordeste e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

Literatura Citada

1. CORK, L. C.; HADLON, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **J. Infect. Dis.**, v. 129, p. 134 – 141, 1974.
2. MELO, A. C. M.; FRANKE, C. R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da Artrite- Encefalite Caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Cienc. Rural**, v. 27, n. 1, p. 113 – 177, 1997.
3. NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **J. Gen. Virol.**, v. 50, p. 69 – 79. 1980.
4. PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G.; ARAÚJO, S.C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Carina em Caprinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101: 557-58, 2006
5. PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Cienc. Rural**, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.
6. PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ANDRIOLI, A. Presença da Artrite-Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do Estado do Ceará. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p. 421-423, 1999.
7. ROITT, I.; BROSTOFF, J. MALE, D. **Immunology**. 5ª ed. London: Mosby, 1998. 423 p.
8. ZEE, Y. C.; HIRSH, D. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 411 – 424.