



## VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

### Produção de antígeno para o diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina com cepas virais nativas do Estado do Ceará: Dados preliminares<sup>1</sup>

Vanderlan Warlington Souza dos Santos<sup>2</sup>, Maria Alzira do Carmo Aragão<sup>3</sup>, Dalva Alana Aragão de Azevedo<sup>4</sup>, Samilly Mesquita Alves<sup>5</sup>, Alice Andrioli<sup>6</sup>, Raymundo Rinaldo Pinheiro<sup>7</sup>,

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

<sup>2</sup>Graduando em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, Sobral/CE. Bolsista EMBRAPA, e-mail: vanderlansouza@zootecnista.com.br

<sup>3</sup>Bióloga, Msc. Professora do Curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, e-mail: alzirac@hotmail.com

<sup>4</sup>Graduanda em Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA. Bolsista CNPq, e-mail: bio\_lana@hotmail.com

<sup>5</sup>Graduanda em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA. Bolsista FUNCAP, e-mail: samillealves@hotmail.com

<sup>6</sup>Pesquisadora Dra. Embrapa Caprinos e Ovinos, e-mail: alice@cnpq.embrapa.br

<sup>7</sup>Orientador, Pesquisador Dr. Embrapa Caprinos e Ovinos e professor do Curso de Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA. Estrada Sobral - Groaíras, Zona Rural, Km 4, CEP: 62011-970, caixa postal 145, Sobral-CE. e-mail: rinaldo@cnpq.embrapa.br (autor para correspondência)

**Resumo:** Objetivou-se com este estudo produzir antígeno para micro-técnica de imunodifusão em gel de agarose (MIDGA) com cepas virais isoladas no Estado do Ceará e compará-la com kit nacional produzido com cepa CAEV Cork. Na produção dos antígenos, utilizou-se um pool das cinco cepas virais do banco de germoplasma de Lentivírus da Embrapa Caprinos e Ovinos (antígeno CAEV Ceará) e a cepa CAEV cork (antígeno nacional). Para comparação entre os antígenos, realizou-se a MIDGA com 198 amostras de soros de caprinos, com mais de seis meses de idade, de nove rebanhos de algumas regiões do Estado do Ceará. Dos 198 soros analisados com o antígeno CAEV Ceará, 175 tiveram resultados negativos e 23 positivos; resultados semelhante aos encontrados com Ag CAEV Cork. Analisando os resultados, encontrou-se uma sensibilidade e uma especificidade, de 95,83% e 99,43%, respectivamente, e o índice Kappa de 0,95. Observou-se valores de 95,83% e 99,43% para valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) respectivamente, sendo a concordância de 99%. Os resultados dos estudos comparativos sugerem que o antígeno produzido a partir de amostras isoladas no Estado do Ceará apresenta resultados semelhantes ao antígeno produzido nacionalmente, podendo ser produzido comercialmente.

**Palavras-chave:** caprinos, Lentivírus; MIDGA

#### **Production of antigen for diagnosis of Caprine Arthritis Encephalitis with native virus strains the state of Ceara: Preliminary data.**

**Abstract:** The objective of this study was to produce antigen microtechnic immuno-diffusion gel (MAGID) with viral strains isolated in the State of Ceará and compare with national kit produced with CAEV Cork strain. In the production of antigens, was used pools of five viral strains of the Lentiviruses germplasm bank of Embrapa of Sheep and Goats (CAEV Ceará antigen) and the CAEV Cork (national antigen). To compare both antigens was held to MAGID with 198 serum samples from goats with more than six months old, from nine herds in some regions of the state of Ceara. Of the 198 sera analyzed using CAEV antigen Ceará, 175 were negative and 23 positive, results similar to those found with Ag CAEV Cork. Analyzing the results, was found a sensitivity and a specificity of 95.83% and 99.43%, respectively, and even Kappa 0.95. Observed values of 95.83% and 99.43% for positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) respectively, with the concurrence of 99%. The results of comparative studies suggest that the antigen produced from samples isolated in the State of Ceará has similar results the antigen produced nationally and can be commercially produced.

**Keywords:** Goats, Lentivirus; MAGID



## VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

### Introdução

O vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) é um lentivírus pertencente à família Retroviridae, subfamília Lentivirinae e causa a Artrite-Encefalite Caprina (CAE). Uma doença infecciosa dos caprinos, que também pode ocorrer em ovinos e se caracteriza como uma enfermidade crônica, incurável, degenerativa, com evolução lenta e de alta prevalência nos rebanhos nacionais. Manifesta-se através de cinco quadros clínicos principais: artrite, encefalite, mamite, pneumonia e emagrecimento crônico (FRANKE, 1998) e tem seu diagnóstico baseado em provas sorológicas, sendo a micro-técnica de imunodifusão em Gel de Agarose (MIDGA), a mais empregada devido, sua alta especificidade e praticidade, sendo o teste indicado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE).

A utilização de kits de diagnóstico da CAE importados tem trazido alguns problemas, tais como a elevação do custo da realização dos testes. Dessa forma, o isolamento, identificação e conservação de cepas do CAEV provenientes de regiões geográficas distintas possibilitam melhorar os testes através do aumento da sensibilidade (PINHEIRO et al., 2007). Diante deste fato, objetivou-se com este estudo produzir antígeno para MIDGA com cepa viral isolada no Estado do Ceará e compará-la com a cepa CAEV Cork.

### Material e Métodos

Na produção de suspensão viral foi utilizada uma amostra infectante originada de um pool das cinco cepas virais do banco de germoplasma de Lentivírus da Embrapa Caprinos e Ovinos. Estas foram isoladas a partir de cabras sorologicamente positivas na micro-técnica de imunodifusão em gel de agarose (MIDGA) oriundas do rebanho da Embrapa Caprinos e ovinos.

Monocamadas semiconfluentes (90 a 95% de confluência) de membrana sinovial caprina (11<sup>a</sup> passagem) cultivadas em garrafa roler de 830 cm<sup>2</sup> de superfície de cultivo, foram inoculadas, 72 a 96 horas após passagem com 15 mL de suspensão viral diluída em meio essencial mínimo (MEM) sem soro fetal bovino (SFB). Após 60 minutos adicionaram-se 135 mL de MEM com 5% de SFB. As garrafas foram inoculadas a 37° C em estufa, sendo observadas diariamente para averiguar a evolução do processo. Coletou-se o sobrenadante semanalmente por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada.

Os sobrenadantes coletados, bem como as garrafas contendo sobrenadante das últimas coletas foram congeladas a -80° C para produção de antígeno. O mesmo processo foi realizado com a cepa padrão CAEV cork. Os sobrenadantes da cepa CAEV cork e do pool de cepas nativas (CAEV Ceará) foram recolhidos e centrifugados separadamente para clarificação e concentrados também separadamente, através da técnica de ultrafiltração pelo sistema AMICON modelo 8400 da Millipore®, utilizando membrana de 10000 Daltons. Os dois sobrenadantes foram concentrados em 50X.

Para a realização do MIDGA foi coletado sangue de 198 animais, com mais de seis meses de idade, de nove rebanhos de algumas regiões do Estado do Ceará. Foi utilizada a micro-técnica de imunodifusão em Gel de Agarose descrita por Gouveia et al. (2000). Os resultados dos testes foram analisados quanto à sensibilidade, especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) e Índice Kappa, utilizado o programa Winepsicope 1.0.

### Resultados e Discussão

Os resultados do MIDGA com os soros dos 198 animais foram classificadas como positivos, quando houve formação de linha de precipitação forte (interação antígeno-anticorpo); fraco-positivo, com linha fraca; e negativas, sem formação de linha de precipitação. Para fins estatísticos e de comparação entre as provas, os resultados fraco-positivos no teste foram considerados positivos. Dos 198 soros analisados com o antígeno (Ag) CAEV nativo (CAEV Ceará), 175 tiveram resultados negativos e 23 positivos. Quando esses soros foram testados frente ao Ag CAEV Cork, obteve-se o mesmo resultado (Tabela 1).



## VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

**Tabela 1:** Resultados obtidos no testes de MIDGA utilizando-se Ag CAEV Cork e Ag CAEV Ceará (pool de cepas nativas).

Resultados do MIDGA com o Ag CAEV Cork	Resultados do MIDGA com Ag CAEV Ceará		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	22	1	23
Negativo	1	174	175
<b>Total</b>	23	175	198

Para obtenção dos valores preditivos, com o intuito de demonstrar a acurácia do teste, considera-se como Valor Preditivo Positivo (VPP) a probabilidade de um resultado positivo ter realmente detectado a doença e como Valor Preditivo Negativo (VPN) a probabilidade de um animal com teste negativo não ter a doença. Os mesmos valores dependem da sensibilidade e especificidade, bem como da situação epidemiológica da doença na região onde foi realizado o teste. O VPP do teste foi de 95,83 %, enquanto o VPN foi de 99,43 %, sendo que, a sensibilidade e a especificidade foram de 95,83 % e de 99,43 %, respectivamente e o índice Kappa (THRUSFIELD, 1995) apresentado foi de 0,95.

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros fundamentais para a caracterização de um teste diagnóstico. A sensibilidade pode ser definida como a probabilidade do teste ser positivo, caso o animal esteja doente, enquanto especificidade é a probabilidade do teste ser negativo no animal não doente. Na comparação dos antígenos através da técnica de MIDGA, verificou-se que a determinação de anticorpos anti-CAEV pelos antígenos foram considerados semelhantes e a concordância observada entre os resultados foi de 99%. Pinheiro et al. (2010), ao compararem dois antígenos para diagnóstico da CAEV, o cepa padrão CAEV Cork e o do Kit Americano, verificaram que o produzido nacionalmente com cepa padrão apresentou boa sensibilidade (75%) e ótima especificidade (93,54%). Estes mesmos autores afirmam que a escolha de um antígeno influencia marcadamente os resultados do MIDGA no diagnóstico das enfermidades causadas pelos LVPR, ressaltando a importância do desenvolvimento de um kit nacional.

Com esses resultados, pode-se supor que o teste de MIDGA produzido com pool de cepas CAEV nativa é muito semelhante ao produzido com a cepa CAEV Cork e pode ser utilizado para o desenvolvimento de kit comercial, o que facilitará aos caprinocultores a realização de testes de triagem e monitoramento da condição sanitária do seu rebanho.

### Conclusões

Pode-se concluir que o antígeno produzido com a cepa CAEV- Ceará apresenta resultados semelhantes ao CAEV- Cork, podendo ser empregado no desenvolvimento de kits comerciais, que poderão ser utilizados como rotina no teste de MIDGA.

### Agradecimentos

À Embrapa Caprinos e Ovinos por ter cedido gentilmente as instalações, além do auxílio financeiro. Ao BNB, CNPq e à FUNCAP pelo auxílio financeiro

### Literatura citada

FRANKE, C. R. Uma virose ameaça o rebanho nacional: artrite encefalite caprina(CAE). **Bahia Agrícola**. V.2, n.3, p 89-92, nov. 1998.

GOUVEIA, A. M. G.; MELO, L. M.; PIRES, L. L.; PINHEIRO, R. R. Microimunodifusão em gel de Agar para o diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27, Águas de Lindóia-SP. **Anais...** Águas de Lindóia: 2000. P.33. Resumo.



## VI CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL



Hotel Thermas - de 29 de Novembro a 02 de Dezembro - Mossoró/RN

PINHEIRO, R. R.; ARAGÃO, M. A. do C.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F.; FEITOSA, A. L. V. L. **Banco de Germoplasma de Lentivirus Nativos de Caprinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2007. 3 p. (Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 83).

PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; ARAGÃO, M.A.C.; MARTINEZ, P.M. Avaliação de antígenos para diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.1, p.133-137, jan./mar., 2010.

THRUSFIELD, M.V. **Veterinary Peidemiology**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1995. 479p.