

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS PARA O DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS EM REBANHO CAPRINO SOB PROGRAMA DE CONTROLE

R.R. Pinheiro¹, A. Andrioli¹, A.M.G. Gouveia², M.A.C. Aragão³, P.M. Martinez⁴

¹Embrapa Caprinos, Setor de Sanidade Animal, Estr. Sobral-Groaíras, km 4, CEP 62010-970, Sobral, CE, Brasil.
E-mail: rizaldo@cnpq.embrapa.br

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo comparar os resultados do diagnóstico do Lentivírus Caprino, por Imunodifusão em Gel de ágar - IDGA, utilizando o kit comercial americano e o kit nacional produzido com cepa CAEV Cork. Foram utilizados dois rebanhos, sendo um da Embrapa Caprinos submetido a doze anos de programa de controle e um outro rebanho infectado pelo CAEV, que não teve nenhuma ação prévia de controle. Analisando os resultados dos antígenos (nacional e americano) no rebanho não controlado, verificou-se que o antígeno comercial americano, quando foi utilizado pela primeira vez para o diagnóstico apresentou resultados mais significativos do que o nacional. Já no rebanho controlado, o antígeno nacional detectou um número maior de positivos. Analisando os dados do trabalho verificou-se a importância da alternância de proteínas imunogênicas presentes no antígeno dos kits de diagnóstico usados em programas de controle da Artrite Encefalite Caprina, haja vista a variação das respostas ao diagnóstico segundo a proteína expressa pelo vírus.

PALAVRAS-CHAVE: Lentivírus, Artrite Encefalite Caprina, diagnóstico, IDGA.

ABSTRACT

ANTIGEN EVALUATION FOR THE DIAGNOSIS OF LENTIVIRUS IN GOAT HERDS UNDER AND NOT UNDER A CONTROL PROGRAM. Caprine arthritis encephalitis is an infection caused by lentivirus and found on all the continents with a high prevalence in the more technified milk-production flocks, causing considerable economic losses for goat production. The aim of this work was the comparison, by Agar gel immunodiffusion (AGID), between the diagnosis using a national test produced with the strain CAEV Cork and an American commercial kit in a controlled flock and in another flock without a control program for goat lentivirus. The controlled flock had been under control for twelve years by Embrapa Goats, while the other flock was infected by CAEV and had not undergone any previous program of control. Analyzing the results of the antigens (national and American) in the uncontrolled flock, it was verified that when the antigen was used for the first time, the American commercial antigen showed more significative results than the national one. In the controlled flock the national antigen detected a higher number of cases. Analysis of the data revealed the importance of the diagnosis kits in caprine arthritis encephalitis control programs, as seen in the variation of the responses to the diagnosis according to the expressed protein for the virus.

KEY WORDS: Lentivirus, caprine arthritis-encephalitis, diagnosis, AGID.

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; EAST, 1997), causando consideráveis perdas econômicas para a produção caprina (GREENWOOD, 1995). De acordo com as resoluções 65/

94 e 66/94 do Mercosul, os países membros do bloco devem certificar-se, em caso de exportação e importação de ovinos e caprinos, que o país de origem dos animais seja livre de Maedi-Visna e de CAE há pelo menos três anos. Essas normas sanitárias salientam a importância econômica do controle e erradicação dessas enfermidades (RIBEIRO, 1993).

²Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, CE, Brasil.

⁴Companhia de Desenvolvimento de Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil.

O controle da CAE baseia-se no teste sorológico dos animais, seguido de separação ou sacrifício dos soropositivos, associado às medidas de manejo que visam a separação precoce entre mãe e crias, acompanhada de alimentação artificial com colostro e leite tratados termicamente ou sucedâneos do leite (EMBRAPA, 1994; GOUVEIA *et al.*, 1994). Além disso, a detecção precoce e a remoção dos animais infectados dos rebanhos são a base do sucesso dos programas de controle (EMBRAPA, 1994; GOUVEIA *et al.*, 1994; ROWE; EAST, 1997), haja vista inclusive que reprodutores infectados pelo vírus da CAE, porém assintomáticos, eliminam o vírus nosêmen e podem ser uma importante fonte de infecção do vírus (ANDRIOLI *et al.*, 2006). A identificação dos animais infectados por lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) é feita de forma indireta utilizando testes sorológicos, sendo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), com antígenos de origem ovina e caprina, o teste comumente empregado (KNOWLES, 1997). A IDGA é o teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para diagnóstico dos LVPR, o qual além de prático, tem baixo custo e boa especificidade (OIE, 2006). Entretanto, segundo HANSON *et al.* (1996), os animais infectados por esses vírus podem apresentar soroconversão tardia e variação nos níveis de anticorpos durante a vida, o que reduz a sensibilidade e tem implicação direta no sucesso de programas de controle.

Devido aos custos menores e à praticidade, os métodos sorológicos são amplamente usados na detecção de anticorpos contra os LVPR, sendo a IDGA o mais usado. PINHEIRO *et al.* (2006b) realizaram um estudo do custo de produção do antígeno e do teste e verificaram que o impacto de um programa de controle da CAE num rebanho é significativo. Segundo estes autores, no Brasil, os custos para a produção de antígeno para IDGA e dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA-Indireto) foram de US\$ 30,53/mL e US\$ 110,25/mL, respectivamente, enquanto os valores de custos de produção estimados para cada testes foram: US\$ 0,93 (IDGA) e US\$ 1,59 (ELISA-I).

Este trabalho teve como objetivo analisar a ação de dois diferentes antígenos do teste IDGA para o diagnóstico em um rebanho sob programa de controle e comparar com rebanho não controlado.

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

subcultivos por tripsinização das células (PINHEIRO *et al.*, 2006a) em um número limitado a 17 passagens. Na produção da suspensão viral utilizou-se amostra padrão (CAEV-Cork*) do LVC com título inicial de 104,8 TCID₅₀/mL. O título, calculado segundo REED; 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) (CASTRO, 1998). Monocamadas semiconfluentes (90 a 95% de confluência) de MSC (13ª passagem), cultivadas em garrafas roller de 830 cm² de superfície de cultivo, foram inoculadas 72 a 96 horas após passagem com 15 mL de suspensão viral com 200 DFS/mL 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 incubadas a 37°C em estufa, sendo observadas diariamente. Coletou-se o sobrenadante semanalmente por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada. Os sobrenadantes (SN) coletados, bem como as garrafas na última coleta, foram congeladas a -80°C para posterior titulação e 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. O SN foi concentrado por pressão de gás nitrogênio diretamente à célula de ultrafiltração utilizando o sistema AMICON®. Solutos com peso molecular superior a 10 kDa foram retidos na membrana e o filtrado foi concentrado 50X o volume inicial. Após a concentração do antígeno, este foi tratado com éter etílico na proporção de 1:1 para clarificação e destruição das glicoproteínas, evidenciando a coreoproteína p28. No antígeno produzido foi colocado 2 x 10⁻⁴M de phenylmethylsulphonyl fluoride** (PMSF) como conservante.

Como antígeno comercial foi utilizado o produto americano (Veterinary Diagnostic Technology, Inc®), derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus contendo glicoproteína 135 do envoltório viral.

Comparou-se a sensibilidade e especificidade relativa do Ag Nacional (AgN) contra o Ag do kit americano (AgA)***. A sensibilidade e especificidade relativas do Ag foram submetidas ao teste de qui-quadrado (χ^2) (TYLER; CULLOR, 1989) e foi calculado o índice de concordância entre os resultados dos dois testes (CAQUINEAU *et al.*, 1988).

*Amostra viral gentilmente cedida pela UFRPE, oriunda do Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants - INRA - ENVL - France.

**Sigma.

***Kit de diagnóstico -Veterinary Diagnostic Technologic, Inc.

No teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) foi utilizada a microtécnica descrita por GOUVEIA *et al.* (2000) em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30 µL de soro/antígeno, com a leitura realizada 48-72 horas após, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura.

O rebanho controlado selecionado para este estudo era constituído de 215 animais leiteiros das raças Saanen e Anglo-Nubiana pertencente à Embrapa Caprinos. A ocorrência da CAE nesta empresa de pesquisa motivou a elaboração e implantação, a partir de 1994, do PCAEV-Programa de Controle da CAE (EMBRAPA, 1994), de forma interinstitucional em parceria com a Escola de Veterinária da UFMG, estabelecendo e avaliando medidas sanitárias e de manejo planejadas estrategicamente dentro do conceito de saúde integrada, visando o controle gradual das lentivirose no rebanho caprino leiteiro do CNPC, em Sobral, CE. As medidas de controle baseiam-se no bloqueio da transmissão do vírus a partir de animais infectados, considerando as vias de infecção conhecidas e as que na época se apresentavam pouco esclarecidas, e, ainda, fatores como soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica, replicação restrita e manejo do rebanho. Procurou-se, inicialmente, minimizar o contato entre animais soropositivos e soronegativos, por meio da separação imediata e identificação dos animais. Para o monitoramento sorológico optou-se pela técnica IDGA, em função da disponibilidade do imunoreagente comercial, maior facilidade de implantação imediata e treinamento da equipe, e considerou-se que a sensibilidade da prova seria adequada aos objetivos iniciais de controle. No PCAEV o monitoramento sorológico semestral, por meio do IDGA, associado às medidas de controle, buscou possibilitar a obtenção de animais soronegativos para gradativa reposição do plantel base. No levantamento inicial verificou-se uma prevalência média no rebanho caprino de 14,3%. Com a implantação das medidas de controle verificamos uma redução para níveis variando de 1% a 2% de incidência. Diante deste resultado verificou-se que as medidas sanitárias surtiram um

bom efeito, entretanto, apesar da queda observou-se uma estabilização das taxas em patamares baixos indicando a presença de falsos-negativos que o IDGA não consegue detectar.

O rebanho não controlado selecionado foi um criatório de caprinos infectados pelo CAEV, onde não havia ação prévia para controle de CAE. O rebanho era constituído de 67 animais animais de raça com aptidão leiteira (Saanen e Anglo-Nubiana) e mestiços que foram submetidos a um teste de IDGA para identificação de positivos.

Nos dados obtidos avaliou-se sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e negativo, e eficiência. Os resultados dos testes foram comparados pelo teste de qui-quadrado com correção de Yates (χ^2) (TYLER; CULLOR, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos dois testes.

Quando aplicou-se o IDGA com antígeno nacional e com o antígeno americano no rebanho controlado verificou-se os seguintes resultados:

- No caso do IDGA em rebanho sem programa de CAE verificou-se que o AgA identificou 10 animais positivos de 74 (13,51%) enquanto que o AgN identificou 8 (10,81%) (Tabela 1).

- Quando o teste de IDGA foi aplicado no rebanho que estava sendo submetido ao programa de controle de CAE, 7,91% dos animais soropositivos (17/215) foram identificados, enquanto que o AgA identificou 1,86% (4/215) (Tabela 2).

Desta forma, analisando os resultados dos antígenos (AgN e AgA) no rebanho não controlado (Tabela 1), verificou-se que, quando o antígeno americano é utilizado pela primeira vez, detecta-se mais animais positivos que o nacional. No rebanho controlado observou-se o contrário, o antígeno nacional (Tabela 2) detectou um número maior de animais soropositivos. Muito provavelmente a retirada dos animais que expressavam anticorpos contra aquelas proteínas virais, ao longo de 12 anos de controle, tenha produzido um efeito de seleção sobre o rebanho caprino e quando aplicado um teste com antígeno diferente daquele utilizado no PCAEV, foi encontrado maior número de animais positivos.

Tabela 1 - Resultado do teste de soros caprinos pelo IDGA AgA, IDGA AgN para o diagnóstico da infecção por LVC em rebanho caprino sem programa de controle.

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA AgN	8	10,81	66	89,19	74
IDGA AgA	10	13,51	64	86,49	74

Tabela 2 - Resultado do teste de soros caprinos pelo IDGA AgA, IDGA AgN para o diagnóstico da infecção por LVC em rebanho caprino submetido a um programa de controle da Artrite Encefalite Caprina.

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA AgN	17	7,91	198	92,09	215
IDGA AgA	4	1,86	211	98,14	215

Tabela 3 - Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), eficiência (Efic), índice Kappa e qui-quadrado para os testes IDGA com Ag nacional em relação ao IDGA com Ag do kit americano de 294 amostras de soro caprino.

	AgAmericano						
	Pos	Neg	Total				
AgNacional	Pos	9	18	27			
1	Neg	3	261	264			
	Total	12	279	294			
Teste	Sens (%)	Espec(%)	VPP(%)	VPN(%)	Efic(%)	Kappa	χ^2*
IDGA AgN	75,0	93,54	33,33	98,86	92,80	0,48	57,01 (p < 0,001)

*Qui-quadrado com correção de Yates.

O AgN detectou principalmente anticorpos antiproteína p28, enquanto o AgA detectou anticorpos anti-gp135. Desta forma, a escolha de um antígeno influencia marcadamente os resultados do IDGA no diagnóstico das enfermidades causadas pelos LVPR, pois a utilização de um antígeno com as duas proteínas (gp 135 e p28) favorece o aumento da sensibilidade.

ADAMS; GORHAM (1986), ao compararem dois antígenos da CAEV, verificaram que o produzido com a gp135 detectou um maior número de animais positivos que o produzido com a 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) utilizaram IDGA para detectar anticorpos em caprinos naturalmente infectados pelo CAEV para os antígenos gp135 e p28 do lentivírus MVV. Observaram que os caprinos testados expressavam anticorpos tanto para gp 135 como para p28. Entretanto, ocorreu maior frequência de anticorpos para gp 135 em animais velhos que reagem a apenas uma das proteínas virais. Além disto, a expressão de anticorpos para o CAEV variou ao longo do tempo evidenciando que reações soropositivas e soronegativas podem ocorrer intermitentemente. O que ressalta a necessidade da utilização conjunta das proteínas nos antígenos para aumentar a sensibilidade da prova.

Presumindo o kit comercial americano como o teste referência, a comparação com o kit nacional desenvolvido na Embrapa Caprinos revelou concordância de 92,8% (p < 0,001) no teste de 294 amostras de soro caprino (Tabela 3). Diante desses resultados verifica-se que o IDGA com antígeno nacional é um teste com boa sensibilidade e uma ótima especificidade. Segundo a classificação do índice Kappa (THRUSFIELD, 1995), o IDGA nacional apresentou uma moderada concordância com o kit comercial americano (Kappa aproximado de 0,5).

A eficiência de programas de controle dos LVPR depende da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização em animais de um determinado rebanho e no manejo utilizado nesse mesmo rebanho. Nos programas de controle ou erradicação, testes com maior sensibilidade e especificidade ou a troca de antígenos do IDGA devem ser utilizados quando ocorrer uma redução substancial dos animais soropositivos e quando a taxa de soroconversão no rebanho, apesar de baixa, é mantida.

Por meio da análise dos dados, verificou-se a importância da alternância dos kits de diagnóstico de proteínas virais diferentes em programas de controle da Artrite Encefalite Caprina uma vez que um rebanho submetido ao controle por um antígeno, que contenha uma determinada proteína específica, com o tempo ele perde a capacidade de detecção em virtude da retirada de todos os animais com o vírus que expressa aquela proteína. Este fato pode ser observado no PCAEV onde, durante 12 anos, o programa vem retirando semestralmente animais positivos do rebanho com kit comercial que apresenta como antígeno viral a glicoproteína 135.

Este trabalho foi financiado pela EMBRAPA Caprinos, pelo Banco do Nordeste e pela Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa - FUNCAP. Agradecemos aos laboratoristas da Embrapa Caprinos: Osmarilda Maria Machado e João Ricardo Furtado, pelo excelente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.S.; OLIVER, R.E.; AMEGHINO, E.; DeMARTIM, J.C.; VERWOERD, D.W.; HOUWERS, D.J.; WAGHELA, S.; GORHAM, J.R.; HYLLSETH, B.; DAWSON, M.; TRIGO, F.J.; McGITIRE, T.C. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Record*, v.115, p.493-495, 1984.

- ADAMS, D.S.; GORHAM, J.R. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Research in Veterinary Science*, v.40, n.2, p.157-160, 1986.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.1313-1319, 2006.
- CAQUINEAU, L.; DOUART, A.; LECOANET, J. Mice au point d'une méthode immunoenzymatique E.L.I.S.A. pour la détection des anticorps anti virus B.V.D. dans le serum des bovines. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v.164, n.5, p.381-386, 1988.
- CASTRO, R.S. *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. 1998. 132p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1998.
- EMBRAPA. Programa de controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV). Subprojeto N° 06.0.94.102-01). *Relatório de consultoria*. Sobral: Embrapa/Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, 1994. 125p.
- GOUVEIA, A.M.; SANTA ROSA, J.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.F.; VIDAL, C.E.S. Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., Recife, PE. *Anais*. Recife, 1994. p.102. Resumo.
- GOUVEIA, A.M.G.; MELO, L.M.; PIRES, L.L.; PINHEIRO, R.R. 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, SP. *Anais*. Águas de Lindóia, 2000. p.33. Resumo.
- GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, v.22, n.1/2, p.71-87, 1995.
- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.37, n.1, p.31-39, 1996.
- KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.13, p.1-11, 1997.
- OIE. World Organisation for Animal Health. Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres, 2006. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: dez/2007.
- 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*, v.101, p.557-558, 2006a.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; TORRES, A.M.C.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F.S.F. Custo dos antígenos no diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.28, p.110-113, 2006b.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, v.27, p.493-497, 1938.
- RIBEIRO, L.A.O. Risco de introdução de doenças exóticas pela importação de ovinos. *Bol. Lab. Reg. Diagn. -UFPEL.*, v13 p.39-44, 1993.
- ROWE, J.D.; EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Pract. The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, v.13, n1, p.35-53, 1997.
- THRUSFIELD, M.V. *Veterinary Peidemiology*. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1995. 479p.
- TYLER, J.W.; CULLOR, J.S. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.194, n.11, p.1550-1558, 1989.

Recebido em 28/1/08
Aceito em 9/3/10