



Inquérito sorológico da artrite encefalite caprina através de Western Blot e Imunodifusão em Gel de Agarose em rebanhos caprinos leiteiros do estado de Minas Gerais

Dalva Alana Aragão Azevedo¹, Samilly Mesquita Alves², Daniele Cristina Timbó Magalhães³, Talysson Bruno Chagas Sousa⁴, Alice Andrioli⁵, Raymundo Rizaldo Pinheiro^{6*}

¹Graduanda em Biologia Bacharelado pela Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, bolsista CNPq/PIBIC;

²Graduanda em Zootecnia pela Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, bolsista FUNCAP;

³Médica Veterinária. Mestranda em Zootecnia pela Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA;

⁴Graduando em Biologia bacharelado pela Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA, bolsista FUNCAP;

⁵Pesquisador EMBRAPA Caprinos e Ovinos;

⁶Prof. Adjunto da UVA / Pesquisador EMBRAPA Caprinos e Ovinos; *Orientador; Autor para correspondência: rizaldo@cnpq.embrapa.br

Resumo: As lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR), constituídas pela Artrite-Encefalite Caprina (CAE) e Maedi Visna (MV), são importantes enfermidades víricas de caprinos e ovinos. Para diagnosticar as LVPR, podem ser realizados testes de imunodiagnóstico, tais como a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e o Western Blot (WB). Objetivou-se com este estudo comparar estas duas técnicas de imunodiagnóstico, a partir de inquérito sorológico da CAE. Foram realizadas coletas de sangue através da punção da veia jugular, em 91 fêmeas nulíparas da raça Saanen provenientes do estado de Minas Gerais. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1500xg por 15 minutos, armazenadas em eppendorf e congeladas a -20°C, até a realização das técnicas. Os soros foram submetidos a análise sorológica por IDGA e WB. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado e ajustadas pelo teste exato de Fisher. Observou-se uma maior detecção de animais soropositivos pelo WB ($p < 0,01$), demonstrando que este é um teste mais sensível que a IDGA, pois pode-se detectar a doença em animais com níveis mais baixos de anticorpos.

Palavras-chave: CAEV, IDGA, WB

Serological survey of caprine arthritis encephalitis in dairy goat herds by western blot and agarose gel immunodiffusion in Minas Gerais state

Abstract: The small ruminants lentivirose (SRLV), comprised of the caprine arthritis-encephalitis (CAE) and maedi visna (MV), are important goats and sheep viral diseases. The SRLV diagnosis may be performed for immunodiagnostic tests, such as agarose gel immunodiffusion (AGID) and Western Blot (WB). The objective of this study was compare these two immunodiagnostic techniques. Blood samples were collected by jugular puncturing in 91 Saanen nulliparous goats from the Minas Gerais state. Blood samples were centrifuged at 1500xg for 15 minutes and frozen at -20 ° C until the realization techniques. Sera were subjected to serological analysis by AGID and WB. Statistical analysis was performed by Chi-square and adjusted by the Fisher exact test. There was a higher detection of seropositive animals by WB ($p < 0.01$), demonstrating that this is a more sensitive test than the AGID, because it can detect the disease in animals with lower levels of antibodies.

Key Words: CAEV, AGID, WB



Introdução

As Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR), constituídas pela Artrite-Encefalite Caprina (CAE) e Maedi Visna (MV), são importantes enfermidades víricas de caprinos e ovinos, tanto pelas perdas de produtividade dos animais e qualidade dos produtos, como também pela depreciação dos rebanhos infectados (ANDRIOLI et al., 2003). Para diagnosticar as LVPR, podem ser realizados testes diretos ou indiretos. Dentre as técnicas indiretas, tem-se a Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA) e o Western Blot (WB). O teste de IDGA é o recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), pois apresenta resultados rápidos, além de um baixo custo para execução, quando comparado com o WB. Entretanto, é um teste sorológico pouco sensível e não detecta animais com baixo título de anticorpos, facilitando a permanência de animais falso-negativos no rebanho (RODRIGUES et al., 2009). O WB é um teste mais sensível, porque consegue detectar níveis mais baixos de anticorpos séricos (PINHEIRO et al. 2006). O objetivo deste estudo foi comparar duas técnicas de imunodiagnóstico, IDGA e WB, a partir de inquérito sorológico da CAE no estado de Minas Gerais.

Material e Métodos

Como universo amostral, foram selecionadas cinco propriedades leiteiras localizadas no estado de Minas Gerais, através de amostragem não probabilística. Foram colhidas 91 amostras de sangue de caprinos por venipuntura da jugular, utilizando-se sistema *Vacutainer*®, de fêmeas nulíparas da raça Saanen. As amostras foram centrifugadas a 1500xg por 15 minutos, armazenadas em eppendorf e congeladas a -20°C, até a realização das técnicas. Na realização da imunodifusão, utilizou-se a microtécnica de IDGA descrita por Gouveia et al. (2000). Para o WB, as proteínas do antígeno inicialmente foram separadas por SDS-PAGE a 12,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose (TOWBIN et al., 1979). A membrana foi bloqueada com PBS Tween (PBS-T) a 0,3%, por 60min e, em seguida, lavada por 5min com PBS-T a 0,05%. Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes. A diluição utilizada para o soro teste foi de 1:50 e para o conjugado, de 1:18000. O tempo de incubação foi de 30 e 60 minutos, respectivamente. A revelação foi feita com diaminobenzidina, 4-cloro-naftol e peróxido de hidrogênio. O antígeno utilizado tanto para IDGA como para WB, foi produzido pela Embrapa Caprinos e Ovinos, a partir de membrana sinovial caprina. Como soros controles, foram utilizados os padrões do Kit americano - *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit*, produzido pelo *Veterinary Diagnostic Technology, Inc*®. Com base nos resultados sorológicos, foram calculadas a especificidade e sensibilidade dos testes realizados. Utilizou-se o Qui-quadrado (χ^2), ajustado pelo teste exato de Fischer, com o auxílio do programa EPI-INFO. O índice *Kappa* também foi analisado, através do programa WinEpiscope 2.0.

Resultados e Discussão

Na IDGA, verificou-se que 60% (3/5) das fazendas apresentavam animais com anticorpos contra CAEV. Entretanto, através do WB, observou-se que todas as cinco fazendas foram positivas. A prevalência média nas propriedades foi de 42,5% pelo WB, variando de 13,3% a 76,9%. Verificou-se que o WB detectou 37 animais positivos, enquanto que o teste de IDGA detectou apenas oito animais positivos, de 91 soros analisados. Todos os animais positivos ou suspeitos no IDGA foram positivos no WB. A comparação entre os dois testes, nas 91 amostras, está descrita na tabela 1. O WB demonstrou uma sensibilidade de 100%, especificidade de 65,1%, valor preditivo positivo 21,6%, valor preditivo negativo 100% e índice *Kappa* de 0,112. Os dados apresentaram diferença estatisticamente significativa pelo teste do Qui-quadrado ($p < 0,01$).



Tabela 1 - Comparação dos resultados do diagnóstico da CAE pelo IDGA e WB.

Western Blotting (WB)	Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	8	29	37
Negativo	0	54	54
Total	8	83	91

Todas as propriedades apresentaram animais soropositivos para CAE, quando utilizado o WB. Este teste detectou um número maior de animais positivos no rebanho quando comparado com a IDGA. Apesar de ser indicado pela OIE para diagnóstico da CAE, o teste de IDGA é limitado por não identificar os animais em fase inicial da infecção, como também, animais com pouca resposta imunológica ou baixa produção de anticorpos (NOGUEIRA et al., 2009). O WB corresponde a um teste mais preciso, porque consegue obter melhores resultados sem apresentar muita variação de erros (PINHEIRO et al., 2006). Segundo Rodrigues et al. (2009), o WB é um teste mais sensível que a IDGA, pois detecta mais precocemente a presença de anticorpos contra o vírus.

Conclusões

Através deste estudo, demonstrou-se que o WB é uma técnica mais sensível que a IDGA, sendo considerado como um teste mais eficaz para o controle sorológico da CAE.

Literatura citada

- ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; GOUVEIA, A. M.G. **Transmissão de doenças infecciosas através das biotecnologias reprodutivas em pequenos ruminantes**. Sobral: EMBRAPA Caprinos e Ovinos, 2003. 26p. (Embrapa, Documentos on line, 51).
- GOUVEIA, A. M. G.; MELO, L. M.; PINHEIRO, R. R. Microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico sorológico de infecção de lentivírus de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27, Águas de Lindóia – SP. **Anais...** Águas de Lindóia, 2000, p. 33 (Resumo).
- NOGUEIRA D. M.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F. **Artrite encefalite caprina viral: um alerta aos produtores**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2009. (Embrapa, Comunicado Técnico)
- 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 Caprina em Caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 557-58, 2006.
- RODRIGUES, A. de S.; SANTOS, V. W. S. dos; BRITO, R. L. L. de; DIAS, R. P.; BRITO, I. F. de; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Comparação de dois testes sorológicos na evolução da infecção natural de caprinos leiteiros com vírus da Artrite Encefalite Caprina – dados preliminares. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 4, João Pessoa – PB. **Anais...** João Pessoa, 2009.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.