

TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA CONTRA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM CORDEIROS

Transfer of passive immunity against small ruminant lentiviruses in lambs

ABSTRACT

To evaluate the transfer of passive immunity against small ruminant lentiviruses (SRLV) in lambs, two experimental groups were established. The first (G1) was composed of lambs subjected to artificial feeding of colostrum of goats positive for SRLV. The second (G2) was the control, consisting of lambs subjected to suckling of colostrum from their negative mothers. Blood samples were obtained before the first feeding, after 24 hours of birth and at 7, 15, 30, 50, 70, 90 and 120 days old. Antibodies to SRLV were surveyed from the techniques of agar gel immunodiffusion (AGID) and immunoblotting (IB). At birth, the animals were seronegative. For G1, after 24 hours, all animals were positive in two serological tests. Negative results began to be observed after 15 days of age by the AGID test. Only IB was able to detect anti-SRLV at 70 days. Regarding G2, all animals tested negative in AGID and IB, from birth to 120 days of age. These data are consistent with the sensitivity and specificity of the serological tests and show that starting at 90 days of age, colostral antibodies to SRLV no longer be detected in the serum of lambs.

Keywords: colostral antibodies, immunodiagnostic, sheep, SRLV.

Palavras-chave: anticorpos colostrais, imunodiagnóstico, LVPR, ovinos.

INTRODUÇÃO

Em ruminantes, a placenta do tipo sindesmocorial impede a passagem de imunoglobulinas, da circulação materna para a fetal (1). Sendo assim, o recém-nascido é desprovido de anticorpos, adquirindo-os após a ingestão de colostro (2).

Por outro lado, a ingestão de colostro pode ser uma importante forma de transmissão de agentes infecciosos, como lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) (3). Logo, em programas de sanidade de caprinos e ovinos, uma das alternativas adotadas para o controle e prevenção dos LVPR é a termização do colostro a 56°C, durante uma hora, para destruição das partículas virais (4).

Este método não prejudica a qualidade do colostro, mas deve-se atentar para a presença de anticorpos anti-LVPR, que serão transferidos, tornando os animais reagentes após a mamada, o que compromete a utilização de testes sorológicos para o diagnóstico (5).

Considerando essas informações, este trabalho teve a finalidade de constatar a transferência de imunidade passiva contra lentivírus de pequenos ruminantes, em cordeiros, avaliando-se a duração da resposta imune adquirida a partir da aplicação de diferentes métodos de imunodiagnóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Os cordeiros que constituíram os grupos experimentais foram filhos de matrizes e reprodutores de rebanho ovino livre de LVPR, monitorado por *immunoblotting* (IB). O primeiro grupo (G1) foi estabelecido por nove cordeiros submetidos à mamada artificial exclusiva de *pool* de colostro de cabras positivas para LVPR, durante as primeiras 24 horas de vida. O segundo grupo (G2) foi o controle, constituído por dez cordeiros, que mamaram colostro naturalmente das suas mães. Amostras de sangue foram obtidas antes da primeira mamada e com 24h, sete, 15, 30, 50, 70, 90 e 120 dias de vida, para condução dos ensaios de imunodiagnóstico.

Os testes de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) foram realizados em placas de petri plásticas (90x15mm), contendo 13mL de gel de agarose a 1% em solução salina fosfatada (PBS). O gel foi perfurado com roseta metálica hexagonal, formando sete poços com capacidade para 25 μ L. O poço central recebeu antígeno e os poços periféricos foram preenchidos com soros a serem testados e soro padrão positivo, de forma intercalada. As placas foram acondicionadas em câmara úmida, a 25°C. Efetuaram-se leituras com 48 e 72 horas, sobre fonte de luz com fundo escuro, observando-se a formação de linhas de precipitação (6).

As provas de IB foram realizadas com base na técnica descrita por Pinheiro et al. (7), com modificações. As proteínas do antígeno, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (MN) passivamente (8). Após o bloqueio, a membrana foi cortada em tiras de 3mm, para incubação com os soros, na diluição de 1:50. O conjugado anti-IgG marcado com peroxidase foi aplicado na diluição de 1:15000. Consideraram-se como positivos os soros cujas tiras apresentaram reação para o polipeptídeo com peso molecular próximo a 28kDa, tendo-se como parâmetro a tira do soro controle positivo e o padrão de peso molecular de proteínas.

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA), sob o número 001.12.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais do G2, constituído por cordeiros que mamaram colostro naturalmente de suas mães negativas, apresentaram resultados negativos nos testes de IDGA e IB, do nascimento aos 120 dias de vida.

Para o G1, antes da ingestão do *pool* de colostro de cabras positivas para LVPR, os cordeiros estavam soronegativos nas provas de IDGA e IB. Após 24 horas do nascimento, todos os animais foram reagentes nos dois testes, devido à absorção de imunoglobulinas anti-LVPR colostrais. Entretanto, resultados negativos começaram a ser observados, pela prova de IDGA, a partir dos 15 dias de idade e somente um dos nove cordeiros foi reagente, neste teste, aos 50 dias. Aos 70 dias, apenas o IB foi capaz de detectar anticorpos colostrais anti-LVPR, em seis animais, e aos 90 e 120 dias, todos os cordeiros estavam soronegativos.

A ocorrência de resultados sorológicos negativos, inicialmente pela prova de IDGA, após o período de positividade, reflete a degradação das imunoglobulinas adquiridas passivamente (9). Logo, por conta do declínio na concentração sérica das imunoglobulinas, somente o teste de IB foi capaz de detectar anticorpos anti-LVPR por mais tempo, por ser mais sensível.

A técnica de IB é a que apresenta maior sensibilidade e especificidade, se comparada ao Elisa indireto e IDGA, sendo indicada como prova confirmatória para o diagnóstico de LVPR (8). Isso se deve à interpretação baseada em reações específicas às proteínas virais e à sua capacidade de detectar positividade em animais com baixos títulos de anticorpos anti-LVPR, conforme foi retratado neste estudo.

A menor sensibilidade observada para a técnica de IDGA pode ser explicada pelos mecanismos de interação antígeno-anticorpo. Enquanto os testes imunoenzimáticos, como o IB, requerem a interação de apenas um epítipo por anticorpo para obter um resultado positivo, o teste de IDGA requer várias destas interações (10). Isto aumenta a sua especificidade, mas diminui a sua capacidade em detectar animais positivos.

Valores epidemiológicos relativos para o teste de IDGA foram determinados neste estudo, adotando-se a técnica de IB como padrão (7). Observou-se sensibilidade de 63%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 100%, valor preditivo negativo de 86%, acurácia de 89%, índice kappa de 0,70, havendo significância pelo teste qui-quadrado ($p < 0,05$).

CONCLUSÕES

A partir dos resultados expostos, conclui-se que aos 90 e 120 dias de vida, anticorpos colostrais anti-LVPR não mais são detectados no soro de cordeiros. Logo, as técnicas de IDGA e IB podem ser aplicadas após este período visando o diagnóstico.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pelo fomento ao projeto e concessão de bolsa de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Feitosa FLF, Birgel EH, Mirandola RMS, Perri SHV. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gama glutamiltransferase no soro sanguíneo. *Cienc Rural*. 2001; 31 (2): 251-255.
2. Silva DFM, Costa JN, Araújo AL, Costa Neto AO, Almeida MAO, Carvalho VS. Proteinograma sérico de cordeiros mestiços (Santa Inês X Dorper) do nascimento até o desmame: efeito do desenvolvimento etário e do monitoramento da ingestão do colostro. *Ci Anim Bras*. 2010; 11 (4): 794-805.
3. Preziuso S, Renzoni G, Allen TE, Taccini E, Rossi G, Demartini JC, Braca G. Colostral transmission of Maedi-visna virus: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. *Vet Microbiol*. 2004; 104: 157-164.
4. Dawson M. Caprine arthritis-encephalitis. In *Practice*. 1987; 9:8-11.
5. Silva SL, Fagliari JJ, Baroza PFJ, Cesco FTRS, Jorge RLN. Avaliação da imunidade passiva em caprinos recém-nascidos alimentados com colostro de cabras ou colostro de vacas. *ARS Vet*. 2007; 23 (2): 81-88.
6. Pinheiro RR, Andrioli A, Gouveia AMG, Aragão MAC, Martinez PM. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arq Inst Biol*. 2010; 77(1): 133-137.
7. Pinheiro RR, Brito RLL, Rodrigues AS, Dias RP, Andrioli A, Gouveia AMG. Protocolo de immunoblotting para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. Comunicado Técnico 122. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos. 2011. 4p.
8. Cruz ET, González RH, Rodríguez AM, Álvarez HR, Ortega MET, Schmid RK, Setién AA. Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia. *Vet Méx*. 2003; 34 (2): 119-127.
9. Féres FC, Lombardi AL, Barbosa TS, Mendes LCN, Peiró JR, Cadioli FA, Perri SHV, Feitosa FLF. Avaliação da transferência de imunidade passiva em cordeiros com até 30 dias de idade. *Braz J Vet Res An Sci*. 2010; 47 (3): 231-236.
10. Celer Jr V, Celer V, Nemcová H, Zanoni RG, Peterhans E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *J Vet Med*. 1998; 45: 183-188.