

MÉTODOS INDIRETOS DE DIAGNÓSTICO DO LENTIVÍRUS CAPRINO

Kelma Costa de Souza¹, Alice Andrioli², Raymundo Rizaldo Pinheiro³, Roberta Lomonte Lemos de Brito⁴, Apoliana de Souza Rodrigues⁵

¹Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa. Bolsista FUNCAP. e-mail: kelma_zoo@hotmail.com

²Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos. email: alice@cnpq.embrapa.br

³Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos. email: rizaldo@cnpq.embrapa.br

⁴Mestranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UVA/Embrapa. Bolsista FUNCAP. e-mail: rolomont@gmail.com

⁵Graduanda do curso de Biologia da UVA email: pollyrodrigues@hotmail.com

Resumo: A artrite encefalite caprina é uma importante infecção em caprinos, causada por retrovírus da subfamília Lentiviridae. É uma doença persistente, progressiva, debilitante, incurável e de alta prevalência em rebanhos leiteiros nacionais estando associada a perdas econômicas da caprinocultura (ANDRIOLI *et al.*, 2006). Uma das medidas de controle desta patologia consiste na separação entre os animais sadios dos portadores, porém como os animais portadores podem não manifestar sinais clínicos, torna-se necessário o auxílio de testes laboratoriais que permitam seu diagnóstico (ABREU *et al.*, 1998). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por exames diretos pela detecção direta da presença do vírus e os indiretos, pela detecção da presença de anticorpos por técnicas sorológicas (PINHEIRO *et al.*, 2001). Os principais testes sorológicos empregados para detecção são a imunodifusão em gel de agarose, ELISA e “Imuno Western Blot” (RUTKOSK *et al.*, 2001). De Andrés *et al.*, 2005 recomenda que se utilize a associação de pelo menos dois testes num programa de controle da infecção. Assim, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar e comparar dois métodos indiretos de diagnóstico do Lentivírus Caprino (IDGA e Western Blot). 30 fêmeas sem raça definida foram submetidas ao diagnóstico de rotina (IDGA) para a detecção de anticorpos contra o lentivírus em associação com Western Blot, não apresentando diferença significativa ($P > 0,05$).

Palavras-chave: artrite encefalite caprina, lentivírus, métodos de diagnóstico

INDIRECT METHODS OF DIAGNOSIS OF THE GOAT LENTIVIRUS

Abstract: The arthritis encephalitis caprine (AEC) is an important infection in goat, caused for retrovirus of the subfamily Lentiviridae. It is persistent, gradual, debilitating, incurable an illness and of high prevalence in national milk flocks being associated the economic losses of the caprinocultura (ANDRIOLI *et al.*, 2006). One of the measures of control of this pathology consists of the separation enters the healthy animals of the carriers, however as the carrying animals can not reveal signals clinical, become assist necessary it of laboratoriais tests that allow its diagnosis (ABREU *et al.*, 1998). The laboratorial diagnosis can be carried through by examinations right-handers for the direct detention of the presence of the virus and the indirect ones, for the detention of the presence of antibodies for sorológicas techniques (PINHEIRO *et al.*, 2001). The chief tests sorológicos employees about to detection they are the one imunodifusão well into gel as of capture (IDGA), ELISA e “Imuno Western Blot” (RUTKOSK *et al.*, 2001). Of Andrés *et al.*, 2005 recommends that if it uses the association of at least two tests in a program of control of the infection. Thus, the objective of the present work was to evaluate and to compare two methods of diagnosis of Lentivírus Caprino indirect (IDGA and Western Blot). 30 females SRD, had been submitted to the diagnosis of routine (IDGA) for the detention of antibodies against the LVC in associação with Western Blot. Did not they presented difference significativa ($P < 0,05$).

Keywords: arthritis encephalitis caprine, lentivírus, methods of diagnosis

Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma importante infecção que acomete a espécie caprina, cujo agente etiológico é um retrovírus da subfamília *Lentiviridae*. É uma doença persistente, progressiva, debilitante, incurável e de alta prevalência em rebanhos leiteiros nacionais estando associada a perdas econômicas (ANDRIOLI *et al.*, 2006). Segundo Cork *et al.*, (1974) as perdas são bastante consideráveis, incluindo: diminuição da vida produtiva e produção leiteira, redução na duração do período de lactação, predisposição da glândula mamária às infecções bacterianas, diminuição da vida útil e aumento da mortalidade de cabritos nascidos de cabras contaminadas. O reservatório e a fonte de infecção são os animais infectados, de ambos os sexos, de várias raças e idades. A CAE se caracteriza por causar artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (CORK *et al.*, 1974). Uma das medidas de controle desta patologia consiste na separação entre os animais sadios dos portadores, mas como uma das características da doença é o longo período de incubação e a ocorrência de animais infectados sem manifestarem os sinais clínicos da enfermidade torna-se necessário o auxílio de testes laboratoriais que permitam seu diagnóstico o mais precocemente possível (ABREU *et al.*, 1998). O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por exames diretos pela detecção do vírus ou de parte dele (DNA ou RNA) e os indiretos, pela detecção da presença de anticorpos por técnicas imunossorológicas (PINHEIRO *et al.*, 2001). Os principais testes sorológicos empregados para detecção são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), ELISA e “Imuno Western Blot” (RUTKOSK *et al.*, 2001). O IDGA é recomendado por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas, tendo grande aceitação na execução de testes de rotina em rebanhos. Entretanto De Andrés *et al.*, (2005) recomenda que se utilize a associação de pelo menos dois testes num programa de controle da infecção. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar dois métodos indiretos (IDGA e Western Blot) de diagnóstico do LVC.

Metodologia

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada em região Semi-Árida do sertão cearense, a 3°42' de latitude Sul e 40°21' de longitude Oeste, numa altitude de 83m. Durante um período de nove meses 30 cabras SRD foram monitoradas pelos testes de IDGA e Western Blot.

O sangue foi coletado por venopunctura da jugular em tubos de 10 ml sem anticoagulante. Para a separação do soro as amostras de sangue foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos, e em seguida armazenadas de forma duplicada em microtubos e estocadas em freezer (-20°C). A avaliação laboratorial dos animais foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica da unidade.

As classificações de positividade e negatividade foram analisadas da seguinte forma: No IDGA em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30µl soro/antígeno (Ag) derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas com cepas de LVC isoladas no Ceará contendo a proteína estrutural p27 (capsídeo), com a leitura realizada 48-72 horas após, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura. No Western Blot, por revelação da Membrana de Nitrocelulose (MN) numa solução de DAB/4-choronaphthol (solução A-12mg de Diaminobenzidine em 12ml de PBS, solução B-5MG de 4-choronaphthol adicionado a 2ml de metanol mais 10ml de PBS, misturando as duas soluções e acrescentando 10µl de H₂O₂ a 30%) por 10 a 15 minutos ao abrigo da luz.

As análises estatísticas foram realizadas pelo método do Qui-quadrado, com valor estabelecido de $p < 0,05$ com correção de Yates, utilizando-se o programa estatístico EPI Info versão 3.2 (2004).

Resultados e Discussão

Na comparação dos testes de IDGA e Western Blot, dos 30 soros testados doze foram positivos no Western Blot e oito no IDGA, não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$) entre

Tabela 1: Associação entre os resultados positivos e negativos obtidos pelas reações de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e Western Blot, em 30 amostras de soro de cabras.

Resultados	IDGA	Western Blot
Positivo	08	12
Negativo	22	18
Total	30	30

ns= Diferença estatística não significativa. Teste do qui-quadrado com correção de Yates resultando em valor de ($P > 0,05$)

Conclusões

As duas técnicas soroiológicas avaliadas podem ser recomendadas e utilizadas como métodos complementares para confirmação do diagnóstico clínico da Artrite encefalite caprina; bem como serem utilizadas em levantamentos clínico-epidemiológicos para determinação das prevalências da doença e/ou da infecção determinada pelo vírus da CAE.

Referências Bibliográficas

- ABREU, S.R.O; ROBERTO, S.; NASCIMENTO, S.A. et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.18, n.2, p.57-60, 1998.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S. et al.. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1313-1319, 2006.
- CORK, L.C.; HADLON, W.J.; CRAWFORD, T.B. Infectious leucoencephalomyelitis of young goats. **The Journal Infectious Disease**, v.129, n. 2, p.134-141, 1974.
- DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J. et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v.25. n.107, p.49-62. 2005.
- PINHEIRO, R. R. **Vírus da Artrite Encefalite: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no estado do Ceará**. UFMG, (2001). 115p. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- RUTKOSKI, J.K.; WERENICZ, R.; REISCHAK, D. et al. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia de polimerase com “primers” degenerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.53, n.6, p.635-640, 2001.