

Comunicado 123

Técnico

Metodologia Científica
On line

ISSN 1676-7675
Sobral, Ce
Novembro, 2011

Método do Dot-Elisa para Diagnóstico da Maedi-Visna

Raymundo Rizaldo Pinheiro¹

Maria Alzira do Carmo Aragão²

Maria de Fátima da Silva Teixeira³

Alice Andrioli¹

Ronaldo Pereira Dias⁴

Introdução

A Maedi-Visna é uma enfermidade viral economicamente importante de ovinos que ocasionalmente afeta caprinos. O vírus Maedi-Visna, um lentivírus, infecta seus hospedeiros por toda a vida. Embora uma parte dos animais infectados apresente-se como sub-clínicos, outros desenvolvem síndromes intratáveis incluindo dispnéia (Maedi) ou sinais neurológicos (Visna). Ambas, Maedi e Visna são efetivamente fatais. As perdas econômicas incluem restrições de exportação, desvalorização do rebanho, abate prematuro, redução da produção de leite por mastite endurativa, dentre outras. Estas perdas podem variar consideravelmente entre os rebanhos.

O Dot-Blot (DB) ou Dot-ELISA é um teste já desenvolvido para diagnosticar patologias virais como reovírus aviário (GEORGIEVA et al., 2002), HIV (HERBELLING et al., 1988), bem como a Artrite Encefalite Caprina (PINHEIRO, 2001; PINHEIRO et al., 2006), no entanto,

não se encontraram, na literatura, registros da utilização desta técnica para diagnóstico da Maedi-Visna. Em virtude da alta sensibilidade, especificidade e um custo baixo (PINHEIRO et al., 2006a), observou-se testá-lo para Maedi Visna.

A técnica baseia-se na sensibilização de membranas de nitrocelulose com Antígeno (Ag) e posterior adição de um Anticorpo (Ac) marcado com peroxidase, para ocorrência de reação e revelação com formação de cor. O princípio é semelhante ao ELISA, no entanto, não requer aparelhagem sofisticada (PINHEIRO, 2001; PINHEIRO et al., 2006). Apresenta, ainda, uma sensibilidade superior a IDGA e uma praticidade que o torna, neste termo, mais vantajoso que o ELISA. Quando comparado ao *Western Blotting* (WB), que é um teste de alta confiabilidade para diagnóstico das lentiviroses de pequenos ruminantes (LVPR), em termos metodológicos, torna-se mais simples visto que não requer a realização da eletroforese. Os resultados são verificados através de manchas (dots), forma semelhante à observação dos resultados do WB.

¹ Med. Vet., D. Sc., Pesquisador Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/ Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP- 62010-970, Sobral/CE. E-mail: rizaldo@cnpq.embrapa.br

² Bióloga, M. Sc.

³ Med. Vet., D. Sc., Universidade Estadual do Ceará

⁴ Zootecn., M. Sc.

Na padronização do DB descrito a seguir foram utilizadas 246 amostras de soro ovino coletadas por venipuntura da jugular provenientes de rebanhos do interior do Ceará, os quais foram testados previamente pela Micro Imunodifusão em Gel de Agarose (MIDGA), utilizando-se o kit comercial Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc, USA.

Protocolo do Dot-ELISA

O antígeno para o teste foi produzido com cepa padrão (K1514) cultivado em células de membrana sinovial ovina de acordo com a metodologia descrita por Pinheiro et al. (2006).

A dosagem de proteínas do antígeno mostrou uma concentração de $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. A partir deste valor, realizou-se uma titulação do antígeno como forma de verificar a menor concentração capaz de promover a reação. Membranas de nitrocelulose foram colocadas no aparelho de Dot e sensibilizadas com antígeno diluído em PBS (Na_2HPO_4 0,5 M; NaH_2PO_4 0,5 M; NaCl; pH 7,4) nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2 $\mu\text{g}/\text{poço}$ e secas durante dez minutos com jato de ar quente. Cada concentração foi feita em quadruplicata com duas réplicas para cada concentração. Após devidamente secas, foram, então, coradas com corante Ponceau e numeradas. A partir desta etapa foram divididas em dois grupos e submetidas a dois tipos de bloqueio. Grupo A, bloqueado com TTBS (Tris 20 mM; NaCl 500 mM, Tween 20 0,05 %, pH7,5) (GEORGIEVA et al., 2002) por 15 minutos e grupo B bloqueado com PBS-Tween 0,3 % por 40 minutos. Passados os respectivos tempos, as membranas foram lavadas duas vezes por dois minutos sob agitação lenta com PBS-Tween 0,05 % e submetidas a duas diluições distintas (1:25 e 1:50) do soro positivo e soro negativo (ambos do kit comercial) durante 30 minutos. Numa etapa seguinte, as membranas foram novamente lavadas e incubadas com conjugado em duas diluições (1:10000 e 1:15000) durante 30 minutos. Passado este período, as membranas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05 %, duas com PBS e reveladas com 4 cloronaftol e diaminobenzidina (DAB). A reação ocorreu em um minuto e a reação foi parada com água destilada. Considerou-se como melhor resultado para efeito da padronização, a maior diluição do antígeno que apresentou melhor diferenciação visual de cor entre o soro positivo e o negativo. A partir deste resultado inicial,

realizou-se um novo teste, no qual se avaliou o desempenho do fraco positivo (do kit americano), testando-se, ainda, as diluições de conjugado 1:10000, 1:15000 e 1:20000. Todas as etapas foram realizadas em estufa a 37°C sob agitação constante.

Para o antígeno, todas as concentrações testadas reagiram especificamente com as diluições do soro utilizadas, revelando a possibilidade de utilização de qualquer título estudado para uso eficiente na execução dos testes. Entretanto, a concentração ótima considerada para efeito de padronização foi a de 0,25 $\mu\text{g}/\text{poço}$ de proteína viral. A melhor diluição do conjugado foi de 1:15000, a qual apresentou melhor distinção visual entre os soros controles positivos e negativos. Ambos os bloqueios tiveram o mesmo desempenho, sendo o bloqueio com TTBS o preferido em virtude de requerer, apenas 15 minutos de ação.

O valor de diluição ótima dos soros empregados na realização dos testes foi de 1:50, entretanto, o Dot foi capaz de detectar as variadas diluições utilizadas (1:25; 1:50) (Fig. 1).

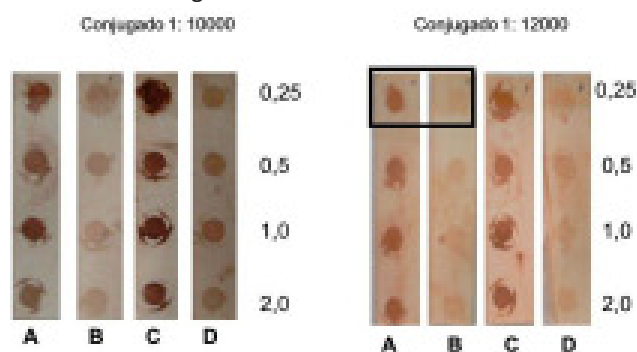


Fig. 1. Resultado das padronizações realizadas. Na vertical encontram-se as diluições de antígeno. Na horizontal encontram-se as diluições do soro, onde A = 1:50+; B = 1:50-; C = 1:25+; D = 1:25-. Bloqueio utilizado: TTBS. A área marcada corresponde a diluição ótima de antígeno e soro.

Durante a análise dos 246 testes, foi possível verificar uma distinção precisa entre os soros positivos e negativos. Devido à utilização de controles positivos e negativos, o poço considerado positivo foi o que visualmente mais se distinguiu do padrão negativo. Estes resultados demonstraram a eficiência do teste no diagnóstico da Maedi-Visna.

Embora não haja dados documentais acerca da distribuição do vírus da Maedi-Visna (MVV) no Brasil, como ocorre no caso do vírus da Artrite-Encefalite Caprina, é importante considerar a ocorrência deste vírus no país. A própria constatação da possibilidade de ocorrência da transmissão entre espécies por si só, já suscita uma atenção maior pelo fato de abrir precedente para a

existência de um diagnóstico cruzado, na medida em que caprinos que poderiam estar sendo diagnosticados como positivos para CAEV, seriam, na verdade positivos para MVV. O Brasil, ainda se encontra no início da implantação de normas sanitárias internas acerca das lentiviruses. O desenvolvimento de testes mais específicos aos respectivos vírus, bem como a utilização de diagnósticos mais rápidos e precisos, faz-se necessário. Suplantar a atual realidade epidemiológica da transmissão poderá em longo prazo, impulsionar a ocorrência de mutações formando cepas virais distintas e mais potentes no que diz respeito a burlar os testes diagnósticos atualmente disponíveis.

Referências

- GEORGIEVA, M.; POPOV, G.; PLOCHEV, K. A. Dot-immunobinding assay to direct antibodies against avian reoviruses. **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 518, p.35-38, 2002.
- HERBELLING, R. L.; KALTER, S. S.; MARX, P. A.; LOWRY, J. K.; RODRIGUEZ, A. R. Dot-immunobinding assay compared with enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and specific detection of retroviruses antibody induced by human or simian acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 765-767, 1988.
- PINHEIRO, R. R. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunienzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará.** 2001. 115 f. Tese (doutorado em medicina veterinária preventiva e epidemiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.
- PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. 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. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 51-56, 2006.

Comunicado Técnico 123 On line

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAIS RICO E PAIS SEM POBREZA

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Caprinos e Ovinos
Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
Home page: www.cnpc.embrapa.br
SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/?pg=sac>

1ª edição
On line (Nov/2011)

Comitê de publicações

Presidente: Marco Aurélio Deolmondes Bomfim
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho.
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos.
Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo.
Editoração eletrônica: Comitê Local de Publicações