

THAÍS ROCHA COUTINHO DITTRICH

**PRODUÇÃO DE REAGENTES PARA O DIAGNÓSTICO
DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor. Curso de
Doutorado em Processos Biotecnológicos,
Setor de Tecnologia, Universidade
Federal do Paraná.**

Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2004

THAÍS ROCHA COUTINHO DITTRICH

**PRODUÇÃO DE REAGENTES PARA O DIAGNÓSTICO
DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora abaixo assinada:

Dr. Marco Aurélio Krieger (orientador)
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Dr. Stenio Perdigão Fragoso
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Dr. Alejandro Corrêa Dominguez
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

Dra. Vanessa Santos Sotomaior
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 09 de dezembro de 2004

"Aqueles que passam por nós, não vão
sós, não nos deixam sós. Deixam um
pouco de si, levam um pouco de nós."

Antoine de Saint-Exupéry

DEDICATÓRIA

Esta tese é uma homenagem à memória de meu querido pai José Rocha Coutinho Júnior, de quem aprendi o valor do estudo e do trabalho honesto, a bênção da caridade sincera, e de quem herdei o amor pela natureza, em especial pelos animais. Saudosamente, dedico a ele com todo carinho e afeição tudo o que aprendi e realizei durante esses anos no curso de Doutorado.

Dedico também este meu trabalho, com gratidão, à minha mãe Jahyra Tesserolli Rocha Coutinho, por ter enfrentado a vida numa época em que à maioria das mulheres era permitido apenas sonhar. Gostaria que soubesse que seus sonhos tolhidos foram sempre a força motriz de minhas realizações profissionais.

Aos meus amados filhos Gustavo e Fábio, pela imensurável felicidade e satisfação que me proporcionam simplesmente em serem como são. Também por terem possibilitado, com sua presença ao longo desses anos de convívio, um encontro comigo mesma, que considero a razão de minha existência terrena.

Ao Roberto, muitíssimo mais que apenas “companheiro de viagem” e amigo; na verdade um presente que Deus, em Sua imensa bondade, colocou na minha vida. “Seja sempre o meu melhor presente”. Eternamente obrigada, sobretudo por ter incessantemente me ajudado a gostar da mulher em que me tornei.

“Se o homem pensasse como o pássaro... festejaria cada amanhecer com uma linda canção.

Se o homem pensasse como o cavalo... ultrapassaria os obstáculos com classe, firmeza e determinação.

Se o homem pensasse como o cão... faria do amor uma constante troca de carinho, lealdade e fidelidade.

Se o homem pensasse como o gato... teria calma e equilíbrio em qualquer dificuldade.

Se o homem pensasse como a abelha... constataria que nada se constrói sozinho.

Se o homem pensasse como a formiga... veria que trabalho e sucesso trilham o mesmo caminho.

Se o homem pensasse como a baleia... veria a importância do poder da solidariedade.

Se o homem tivesse a pureza e a simplicidade de ser dos animais... a paz mundial deixaria de ser um sonho e seria uma realidade!”

(Texto de autoria desconhecida)

Aos animais, especialmente aos da espécie bovina, pela subsistência que garantem aos seres humanos, meu esforço, meu trabalho e meu respeito.

“Disseram-vos que a vida é escuridão; e no vosso cansaço, repetis o que os cansados vos disseram. E eu vos digo que a vida é realmente escuridão, exceto quando há um impulso. E todo impulso é cego, exceto quando há saber. E todo saber é vão, exceto quando há trabalho. E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor. E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios, e uns aos outros, e a Deus. E que é trabalhar com amor?... É pôr em todas as coisas que fazeis um sopro de vossa alma...”

Gibran Khalil Gibran, do livro O Profeta.

A todas as pessoas que trabalham ou que já trabalharam no IBMP sem qualquer exceção. Considero que, com o seu esforço pessoal, cada um de vocês possibilitou o desenvolvimento desta tese. Obrigada por tudo, pois tenho a consciência de ter sido apenas uma parte do todo.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Marco Aurélio Krieger, orientador deste trabalho, pelo otimismo peculiar de sua pessoa e pela paciência no tratamento para comigo, qualidades que com certeza alimentaram minha perseverança.

Ao Doutor Stenio Perdigão Fragoso por sua disposição inabalável e atenção com que sempre me recebeu para troca de idéias, gerando em minha alma um sentimento de elevada estima.

À Professora Rita Maria Venancio Mangrich Rocha pela execução da parte de Hematologia deste estudo, agradecimento este extensivo aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário para Animais de Companhia, Cynthia Cristina Venancio da Silva e Sérgio Benício de Almeida. À Rita, que é especial pelo seu senso de coleguismo, agradeço também pela ajuda imprescindível em minhas obrigações na PUC-PR nos últimos meses.

À Karla Bruning de Oliveira, minha querida ex aluna, pela continuidade que deu ao meu trabalho de desenvolvimento do antígeno para o diagnóstico da LEB e pela ajuda em várias etapas deste trabalho.

Ao futuro Zootecnista e funcionário da PUC-PR, Alceu Miguel Grebogi, bem como à colega e amiga Cristina Santos Sotomaior pelo auxílio na obtenção das amostras biológicas utilizadas neste estudo.

Ao Médico Veterinário Eurico Eloi Ferreira Júnior da Divisão de Biotério do TECPAR, unidade Araucária, pelo prestimoso auxílio neste trabalho.

Ao Biólogo Edmilson Domingos da Silva de BioManguinhos pela obtenção de antissoro direcionado ao antígeno recombinante.

Aos colegas Médicos Veterinários da EMBRAPA Gado de Corte em Campo Grande - MS pelo envio de reagentes.

Aos Funcionários do TECPAR, Ubirajara José da Costa Schier e Jandira Gabriel de Oliveira pela ajuda imprescindível na fase inicial do desenvolvimento do primeiro antígeno viral do TECPAR.

Ao Fábio Dittrich pela execução de quase todas as figuras da tese e ao Gustavo Dittrich por me ensinar várias vezes como trabalhar no “Power Pointer”.

Às Diretorias de 1999 e 2003 do TECPAR pela oportunidade de poder iniciar e concluir o Curso de Doutorado.

À Pró - Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da PUC-PR pela concessão de bolsa auxílio durante três anos do Curso de Doutorado.

Ao Professor Sylvio Péllico Netto, Decano do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da PUC-PR pela confiança que deposita em meu trabalho como professora e pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao Professor Antonio Felipe P. F. Wouk, Diretor do Curso de Medicina Veterinária da PUC-PR no ano de 1999, pela liberação funcional para a realização do Doutorado. Também à Direção atual, Professores Rodrigo Távora Mira e Cláudia Turra Pimpão, pela continuidade do apoio e também pelo incentivo.

Ao Professor Álvaro Luis Mathias, gostaria de externar minha admiração pelo seu modo de ser.

À Coordenação do Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná

Aos colegas do Doutorado João Carlos Minozzo e Rosângela Clara Paulino pelo companheirismo, que permitiu ter superado as dificuldades durante a fase de obtenção dos créditos teóricos.

Ao meu eterno Professor, Metry Bacila, que considero ser a pessoa que mais ajudou em minha ascensão profissional.

Ao meu amigo Maurício Bacila, cuja convivência eu lastimavelmente perdi, mas cujo incentivo e ajuda para realizar o Doutorado nunca serão esquecidos.

Aos amigos Aurora Luzia Pedroso e Renato Rau pelo reconhecimento ao meu esforço pessoal em tentar realizar um trabalho de qualidade no TECPAR.

À Vanessa Santos Sotomaior, cuja empatia outrora existente, se transformou em amizade durante o convívio no IBMP, agradeço tudo o que tem feito por mim, tanto no aspecto profissional como no pessoal.

À Doutora Ana Cláudia Soares Costa e ao Doutor Jorge Tamaki, competentes profissionais em suas áreas de atuação, por minimizarem respectivamente as dores psíquicas e físicas que, como todo ser humano, tenho padecido.

À Denise Cury, cuja presença e auxílio durante a elaboração escrita da tese foram essenciais.

À Maria Salete Fernandes pela dedicação com que tem cuidado, todos esses anos, dos afazeres domésticos em minha casa.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, auxiliaram para que este trabalho se concretizasse e que, por minhas limitações humanas, acabei não mencionando.

A Deus, Energia infinitamente superior ao ser humano, por ter conseguido, mesmo apesar de todas as dificuldades, chegar ao final de mais uma etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	1
1.2 A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA (LEB)	2
1.2.1 Histórico.....	3
1.2.2 Descoberta do Agente Etiológico.....	4
1.2.3 Transmissão.....	4
1.2.4 Quadro Clínico.....	5
1.2.5 Prevalência.....	6
1.2.6 Aspectos Econômicos e Sanitários.....	9
1.2.7 Prevenção e Controle.....	11
1.3 O AGENTE ETIOLÓGICO DA LEB.....	12
1.3.1 A Família <i>Retroviridae</i>	12
1.3.2 O Grupo HTLV-BLV.....	14
1.3.3 O VLB.....	15

1.4 O DIAGNÓSTICO DA LEB.....	16
1.4.1 Diagnóstico da Infecção com o VLB.....	16
1.4.1.1 Testes sorológicos.....	16
<i>Imunofluorescência.....</i>	16
<i>Radioimunoensaio.....</i>	17
<i>Virusneutralização.....</i>	17
<i>Fixação de Complemento.....</i>	17
<i>Teste de inibição sincicial.....</i>	17
<i>Imunoblot.....</i>	18
<i>Teste de AGID.....</i>	18
<i>Teste ELISA.....</i>	18
1.4.1.2 Detecção do vírus.....	19
<i>Isolamento viral.....</i>	19
<i>Bioensaio em ovinos.....</i>	19
<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</i>	19
1.4.2 Diagnóstico de Linfocitose Persistente (LP)	20

1.4.3 Diagnóstico do Linfossarcoma.....	20
---	----

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DAS CÉLULAS FLK-BLV.....	22
--------------------------------------	----

2.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	24
------------------------------------	----

2.2.1 COLHEITA DA MATÉRIA PRIMA.....	24
--------------------------------------	----

2.2.2 PREPARAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA.....	25
--	----

2.2.3 ANÁLISE DA MATÉRIA PRIMA.....	25
-------------------------------------	----

2.2.3 1 PESQUISA DE BACTÉRIAS NA MATÉRIA PRIMA.....	25
---	----

2.2.3 2 PESQUISA DE FUNGOS NA MATÉRIA PRIMA.....	26
--	----

2.3 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO.....	26
---------------------------------	----

2.4 PURIFICAÇÃO DO VLB.....	28
-----------------------------	----

2.5 OBTENÇÃO DO SORO ESPECÍFICO.....	29
--------------------------------------	----

2.6 COLHEITA, PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	30
--	----

2.6.1 ANIMAIS TESTADOS.....	30
-----------------------------	----

2.6.2 COLHEITA DE SANGUE TOTAL.....	34
2.6.3 PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	35
2.6.3.1 COLHEITA E CONSERVAÇÃO DO PLASMA SANGÜÍNEO.....	36
2.6.3.2 OBTENÇÃO DO DNA LINFOCITÁRIO.....	36
2.7 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AGID.....	40
2.8 DESENVOLVIMENTO DE TESTE ELISA.....	44
2.8.1 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO.....	44
2.8.2 METODOLOGIA EMPREGADA.....	44
2.8.3 TITULAÇÃO DOS REAGENTES.....	46
2.8.4 TESTE DAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	47
2.8.5 TESTE DOS SOROS DE REFERÊNCIA.....	49
2.9 TÉCNICA DA PCR - TR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEB.....	49
2.9.1 DESENHO DOS INICIADORES.....	51
2.9.2 METODOLOGIA EMPREGADA.....	52
2.9.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS CÉLULAS FLK-BLV.....	53
2.10 METODOLOGIA DO HEMOGRAMA.....	57

2.10.1 CONFECÇÃO DOS ESFREGAÇOS SANGÜÍNEOS.....	57
2.10.2 AVALIAÇÃO DA SÉRIE VERMELHA.....	57
2.10.2.1 CONTAGEM DOS ERITRÓCITOS.....	57
2.10.2.2 DETERMINAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR.....	58
2.10.2.3 DOSAGEM DA HEMOGLOBINA CIRCULANTE.....	59
2.10.2.4 CÁLCULO DOS ÍNDICES HEMATIMÉTRICOS.....	61
2.10.3 AVALIAÇÃO DA SÉRIE BRANCA.....	61
2.10.3.1 CONTAGEM TOTAL DOS LEUCÓCITOS.....	61
2.10.3.2 CONTAGEM DIFERENCIAL DOS LEUCÓCITOS.....	62
2.11 EXAMES BIOQUÍMICOS.....	63

3 RESULTADOS

3.1 PROVA DE AGID.....	65
3.2 TESTE ELISA.....	66
3.2.1 Concentração Protéica do Antígeno.....	66
3.2.2 Titulação dos Reagentes.....	66

3.2.3 Resultado das Amostras de Campo.....	70
3.2.4 Resultado dos Soros de Referência.....	71
3.3 TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL.....	71
3.4 RESULTADO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE AGID E DA PCR - TR.....	72
3.5 RESULTADO DO TESTE ELISA, EM VALORES DE ABSORBÂNCIA, CONSIDERANDO A REATIVIDADE DAS AMOSTRAS NAS PROVAS DE AGID E DA PCR - TR.....	73
3.6 DETERMINAÇÃO DA “GRAY ZONE” PARA O TESTE ELISA DESENVOLVIDO.....	74
3.7 INTERAÇÕES ENTRE AS TÉCNICAS DE AGID, ELISA E PCR-TR.....	75
3.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EXAMINADOS.....	76
3.8.1 Dados da Série Vermelha.....	76
3.8.2 Dados da Série Branca.....	78
3.8.2.1 Número total e fórmula percentual de leucócitos.....	78
3.8.2.2 Contagem diferencial leucocitária absoluta.....	79
3.8.3 Dados Bioquímicos.....	80

3.8.3.1 Proteína plasmática.....	80
3.8.3.2 Fibrinogênio.....	81
4 DISCUSSÃO	
4.1 PROVA DE AGID.....	83
4.2 TÉCNICA DA PCR-TR.....	86
4.3 VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS DA AGID E DA PCR-TR.....	88
4.4 DETERMINAÇÃO DE UM PONTO DE CORTE ÚNICO PARA O TESTE ELISA.....	89
4.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	93
4.5.1 Correlação Entre as Técnicas de AGID e PCR-TR.....	93
4.5.2 Correlação Entre a Técnica de PCR-TR e os Testes de AGID e ELISA...95	
4.6 ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	99
4.7 O USO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA O CONTROLE DA LEB NO BRASIL.....	103
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AGID	- Agar Gel ImmunoDiffusion (imunodifusão em gel de agar)
°C	- Grau(s) Celsius
CaCl ₂ 2 H ₂ O	- Cloreto de cálcio dihidratado
CAS	- Caldo de Soja Trypticaseína
CHGM	- Concentração de Hemoglobina Globular Média
cm ²	-Centímetro (s) quadrado
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	- Desoxirribonucleosídeos Trifosfatados
EDTA	- Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
EMBRAPA	- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FLK-BLV	- Fetal Lamb Kidney-Bovine Leukosis Virus (células de rim de feto de ovelha cronicamente infectadas pelo vírus da leucose bovina)
FUN	- Solução de Anfotericina B
g	- Grama(s)
g/dL	- Grama(s) por decilitro
Hb	- Hemoglobina
HCl	- Ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
Ht	- Hematócrito
HVAC	- Hospital Veterinário para Animais de Companhia
IBMP	- Instituto de Biologia Molecular do Paraná
KCl	- Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	- Fosfato de potássio monobásico
L	- Litro (s)
LEB	- Leucose Enzoótica Bovina
M	- Mol
MC	- Meio de Crescimento
MCC	- Meio de Congelamento Celular
ME	- Meio Estoque
mg	- Miligrama (s)
µg	- Micrograma (s)
MgCl ₂ 6 H ₂ O	- Cloreto de magnésio hexahidratado
mg/mL	- Miligrama (s) por mililitro
mL	- Mililitro (s)
µL	- Microlitro (s)
µm	- Micrômetro (s)
mM	- Milimol
MM	- Meio de Manutenção
mm	- milímetro (s)
mm ³	- Milímetro (s) cúbico
N	- Normal

NaCl	- Cloreto de sódio
Na ₂ CO ₃	- Carbonato de sódio
Na ₂ HPO ₄	- Fosfato de sódio dibásico
NaHCO ₃	- Bicarbonato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NEO	- Solução de sulfato de neomicina
nm	- Nanômetro (s)
OIE	- Organização Internacional de Epizootias ¹
%	- Por cento
P.A.	- Pró-análise
PBS	- Phosphate Buffered Saline (solução salina tamponada com fosfatos)
PCR	- Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)
PCR-TR	- Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real
PEN	- Solução de penicilina G potássica
pH	- Potencial hidrogênio iônico
P.M.	- Peso Molecular
PUC-PR	- Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RC	- Reagente de Cor
RNA	- Ácido Ribonucléico
RPM	- Rotações por minuto
SDS	- Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	- Soro Fetal Bovino
Taq DNA polimerase	- Enzima DNA Polimerase extraída de <u>Thermus aquaticus</u>
TECPAR	- Instituto de Tecnologia do Paraná
TIO	- Meio Líquido de Tioglicolato
TMB	- Tetrametilbenzidina
TVS	- Trypsin Versene Solution (solução de tripsina e versene)
UI	- Unidade (s) Internacional (is)
UI/mL	- Unidade (s) Internacional (is) por mililitro
VGM	- Volume Globular Médio
VLB	- Vírus da Leucose Bovina
X g	- Força gravitacional

¹ Embora a sigla permaneça a mesma, o nome atual dessa Instituição passou a ser Organização Mundial de Sanidade Animal.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - A LEB NO BRASIL.....	7
TABELA 2 - VOLUME DE PBS, TVS E MC UTILIZADO EM CADA GARRAFA DE CULTIVO CELULAR.....	24
TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DOS BOVINOS DOADORES DAS AMOSTRAS DE SANGUE UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.....	31
TABELA 4 - PARÂMETROS UTILIZADOS NA PCR-TR.....	53
TABELA 5 - VALORES NORMAIS DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA A ESPÉCIE BOVINA.....	64
TABELA 6 - RESULTADO DA PROVA DE AGID EM 2000 E EM 2003...	65
TABELA 7 - RESULTADOS DA PRIMEIRA TITULAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE ELISA.....	67
TABELA 8 - TITULAÇÃO DEFINITIVA DOS REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE ELISA.....	69
TABELA 9 - RESULTADOS DO TESTE ELISA.....	70
TABELA 10 - REATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE CAMPO NA PCR-TR.....	71
TABELA 11 - INTERAÇÃO AGID E PCR-TR.....	72

TABELA 12 - VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA OBTIDOS PELAS AMOSTRAS NÃO REAGENTES NAS TÉCNICAS DE AGID E PCR-TR.....	73
TABELA 13 - VALORES DE ABSORBÂNCIA INTERPRETADOS COMO RESULTADOS INDETERMINADOS (“GRAY ZONE”) NO TESTE ELISA.....	74
TABELA 14 - RESULTADO GERAL DAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	75
TABELA 15 - RESULTADOS DO ERITROGRAMA.....	77
TABELA 16 - RESULTADOS DA CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS E DA CONTAGEM RELATIVA DE CADA TIPO LEUCOCITÁRIO.....	78
TABELA 17 - RESULTADOS DA CONTAGEM ABSOLUTA DOS TIPOS LEUCOCITÁRIOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	79
TABELA 18 - RESULTADOS DA DOSAGEM DE PROTEÍNA PLASMÁTICA CONTIDA NAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	81
TABELA 19 - ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE FIBRINOGÊNIO.....	81
TABELA 20 - COMERCIALIZAÇÃO DO ANTÍGENO PRODUZIDO NO TECPAR.....	84
TABELA 21 - PARÂMETROS CONSIDERADOS PARA O CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA.....	90

TABELA 22 - RESULTADOS OBTIDOS E VALORES DE SENSIBILIDADE E DE ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA PARA CADA PONTO DE CORTE SELECIONADO.....	91
TABELA 23 - RESULTADOS CONCORDANTES NAS TRÊS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DESENVOLVIDAS.....	95
TABELA 24 - RESULTADOS DIVERGENTES NAS TRÊS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DESENVOLVIDAS.....	96
TABELA 25 - INDICATIVO DA PRESENÇA DA LEB CONSIDERANDO O NÚMERO DE LINFÓCITOS CONFORME A IDADE DO ANIMAL.....	101

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO GRUPO HTLV-BLV.....	14
FIGURA 2 - CENTRIFUGAÇÃO DO SANGUE TOTAL PARA A OBTENÇÃO DO PLASMA SANGÜÍNEO E DO “BUFFY COAT”.....	36
FIGURA 3 - SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS POR MEIO DE CENTRIFUGAÇÃO, UTILIZANDO FICOLL-PAQUE PLUS.....	37
FIGURA 4 - DISPOSIÇÃO DOS FURADORES NO CORTADOR PADRÃO PARA TÉCNICA DE AGID.....	41
FIGURA 5 - DISPOSIÇÃO DOS REAGENTES E AMOSTRAS-TESTE NAS PLACAS DE AGID.....	42
FIGURA 6 - TIPOS DE REAÇÕES OBSERVADOS NAS AMOSTRAS TESTADAS PELA AGID.....	43
FIGURA 7 - ETAPAS DO TESTE ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS.....	45
FIGURA 8 - FUNDAMENTO DA PCR-TR, UTILIZANDO O FLUORÓFORO SYBR® GREEN.....	50
FIGURA 9 - FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO SYBR® GREEN VERSUS CICLO DE AMPLIFICAÇÃO.....	51
FIGURA 10 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DA PRIMEIRA TITULAÇÃO DOS REAGENTES DO TESTE ELISA.....	67

FIGURA 11 - ILUSTRAÇÃO DOS RESULTADOS DA TITULAÇÃO DEFINITIVA DOS REAGENTES DO TESTE ELISA.....	69
FIGURA 12 - LICENÇA DO ANTÍGENO PARA DIAGNÓSTICO DA LEB.....	85
FIGURA 13 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DA PCR-TR.....	87
FIGURA 14 - VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA VERSUS CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS NA AGID.....	88
FIGURA 15 - VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA VERSUS CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS NA PCR-TR.....	89
FIGURA 16 - CURVA ROC.....	93
FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EVIDENCIANDO A gp60 do VLB OBTIDA EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO.....	106
FIGURA 18 - ANÁLISE POR “WESTERN BLOTTING” DA gp60 RECOMBINANTE EXPRESSA EM CÉLULAS DE INSETO Sf-9.....	107
FIGURA 19 - UTILIZAÇÃO DO CENTRIPREP-30 PARA A CONCENTRAÇÃO DO ANTÍGENO.....	122

ANEXOS

ANEXO 1 - SOLUÇÕES E MEIOS UTILIZADOS NO CULTIVO DAS CÉLULAS FLK-BLV.....	116
ANEXO 2 - CONGELAMENTO E ESTOCAGEM DAS CÉLULAS FLK-BLV.....	119
ANEXO 3 - MEIOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA.....	120
ANEXO 4 - PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DO CENTRIPREP-30 (SISTEMA AMICON).....	121
ANEXO 5 - TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DO VLB.....	123
ANEXO 6 - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA SEPARAÇÃO DOS LINFÓCITOS.....	124
ANEXO 7 - SOLUÇÃO UTILIZADA NA DESCONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	125
ANEXO 8 - CONTEÚDO DOS TAMPÕES E DA COLUNA UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO DO DNA LINFOCITÁRIO.....	126
ANEXO 9 - SOLUÇÃO, TAMPÃO E GEL DE AGAR UTILIZADOS NA PROVA DE AGID.....	127
ANEXO 10 - MÉTODO DE BRADFORD PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA.....	128
ANEXO 11 - TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NO TESTE ELISA.....	130
ANEXO 12 - TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS CÉLULAS FLK-BLV.....	132
ANEXO 13 - COLORAÇÃO DE WRIGHT.....	135
ANEXO 14 - SOLUÇÕES PARA CONTAGEM DE CÉLULAS SANGUINEAS.....	136

RESUMO

O interesse pelo estudo da leucose enzoótica bovina (LEB) tem sido cada vez maior, não somente como modelo para o entendimento de enfermidades humanas e animais recém reconhecidas, como também pelo temor do potencial zoonótico atribuído ao vírus da leucose bovina (VLB) e a outros retrovírus animais. No Brasil, essa virose foi introduzida na década de 70 pela importação de animais infectados. Como nenhum programa de controle foi implantado, a doença disseminou-se e vem sendo relatada em vários estados do país. A ausência de reagentes padronizados no mercado interno evidencia-se como um ponto de estrangulamento na efetivação do diagnóstico e, conseqüentemente, tem sido o principal obstáculo para se estabelecer um programa de controle da LEB. Neste estudo objetivou-se o desenvolvimento e a padronização de reagentes biológicos, visando sua produção industrial. Esses insumos foram utilizados em provas imunológicas, AGID e ELISA, a fim de se detectar a presença de anticorpos direcionados ao VLB. Os resultados obtidos na execução dessas técnicas foram validados pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (PCR-TR), que foi considerada o teste padrão ouro nesse experimento, identificando no sangue dos animais infectados, o DNA proviral do VLB. Para a correlação dos resultados com a forma clínica da enfermidade, certos parâmetros hematológicos foram avaliados por meio do hemograma e de alguns exames bioquímicos. Cinquenta amostras de sangue de animais provenientes de um rebanho bovino leiteiro naturalmente infectado foram examinadas pelos testes de AGID, ELISA e PCR-TR. Obteve-se uma concordância de resultados nos três métodos de diagnóstico em 62 % das amostras, sendo 27 positivas e 4 negativas. Ao se observar os resultados divergentes, pôde-se notar que os testes imunológicos falharam na identificação de oito animais infectados, considerando que os mesmos apresentaram reatividade na PCR-TR. Em contrapartida, em quatro animais que apresentaram anticorpos detectáveis pelas técnicas de AGID e ELISA, não foi possível a amplificação de parte do DNA proviral pela PCR-TR nos linfócitos circulantes. O teste ELISA apresentou maior sensibilidade que a prova de AGID, no entanto, gerou um resultado falso negativo e outro falso positivo em relação às demais técnicas. Três da cinquenta amostras apresentaram linfocitose, alteração relacionada à LEB. Este estudo demonstra que as provas imunológicas de AGID e ELISA, desenvolvidas com os reagentes produzidos neste trabalho, poderiam ser utilizadas como testes de triagem em um programa de controle da LEB, salientando-se que os resultados negativos em animais provenientes de rebanhos infectados deveriam ser confirmados ou não pela PCR-TR.

Palavras-chave: vírus da leucose bovina (VLB), diagnóstico, reagentes, AGID, ELISA, PCR-TR.

ABSTRACT

The ever-greater interest in EBL is prompted by its usefulness as a model system to understand newly recognized human and animal diseases, as well as by the fear of the zoonotic potential attributed to BLV and other animal retroviruses. The EBL was introduced in Brazil through infected animals imported in the 70's. No control program has been implemented since then; thus, the disease was disseminated and has been reported in many states of the country. The absence of standardized reagents in the local market has been the major obstacle to establish a control program for EBL. The purpose of this study was the development and standardization of biological reagents to aim at their industrial production. These ones were used in immunological tests, AGID and ELISA, in order to detect VLB antibodies. Also, a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was developed for BLV proviral DNA detection in blood of infected animals and used as the gold standard test to validate AGID and ELISA results. Some hematological parameters were evaluated by hemogram and biochemical examinations in order to correlate the results and the disease clinical expression. Fifty blood samples of animals from a naturally infected bovine dairy herd were examined by AGID, ELISA and RT-PCR. The agreement of the three tests was obtained for 62 % of the samples, twenty-seven were positive and four were negative. The AGID and the ELISA assays failed to identify eight infected animals, which were positive in RT-PCR assay. On the other hand, four animals were positive in the serological assays and negative in RT-PCR. ELISA test showed higher sensibility than AGID; however it reproduced a negative false result and a positive one in relation to the other techniques. Lymphocytosis, a clinical sign of EBL, was present in three blood samples. This study demonstrates that AGID and ELISA could be used as screening tests in a control program of EBL. In these assays, the negative results from infected herds should be confirmed or refused by RT-PCR.

Key words: bovine leukemia virus (BLV), diagnosis, reagents, AGID, ELISA, PCR-TR.

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

As importações de animais nas últimas décadas carregaram para dentro do território brasileiro diversas enfermidades, dentre as quais destacam-se as de etiologia viral.

Os prejuízos econômicos acarretados por essas viroses, disseminadas em várias espécies animais, geram a necessidade premente de seu controle, cuja principal forma de viabilização é a identificação de animais portadores por meio de testes laboratoriais.

A efetivação do diagnóstico laboratorial das muitas viroses instaladas - e algumas já difundidas pelo Brasil - é economicamente inviável devido ao alto custo da importação de reagentes e à dificuldade burocrática que esse procedimento requer.

A carência de reagentes biológicos no mercado interno, antígenos e anti-soros, evidencia-se como um ponto de estrangulamento no diagnóstico e, conseqüentemente, no controle de muitas doenças virais, o que contribui para a baixa taxa de desfrute existente no rebanho nacional.

Atualmente, essa situação apresenta mais um agravante em função da globalização de mercados em que as exigências sanitárias passam a ser a principal barreira na exportação de produtos de origem animal.

Dentre as enfermidades virais introduzidas pela importação de animais infectados e atualmente já disseminadas pelo país, destaca-se a leucose enzoótica bovina (LEB), “por ser uma virose que pode comprometer o sistema imunológico dos animais afetados, aumentando sua suscetibilidade a outras doenças infecciosas”, conforme observado por FERRER (1980).

Essa doença não se manifesta clinicamente na maior parte dos animais infectados pelo vírus da leucose bovina (VLB), podendo estes portadores sadios transmitir o agente e disseminar a enfermidade (FERREIRA et al., 1981).

Por esta razão, é de suma importância a experiência de outros países, especialmente na Europa, que vêm implementando programas de controle e erradicação da LEB, baseados na detecção de animais portadores através de testes laboratoriais, o que destaca o papel dos mesmos no controle e na prevenção da enfermidade (JOHNSON e KANEENE, 1992).

Torna-se, pois, evidente que a disponibilidade no mercado nacional, de reagentes de uso laboratorial para o diagnóstico da LEB a um custo acessível é uma etapa imprescindível para a efetivação do controle desta doença no Brasil.

1.2 A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA (LEB)

Segundo SORENSEN (apud BARROS e LEMOS, 1998), o termo “leucose bovina” define uma enfermidade tumoral de células linfóides, sendo a neoplasia maligna mais freqüente em bovinos de leite, ocorrendo também com freqüência em bovinos de corte. Outros termos, tais como linfossarcoma, linfoma maligno, linfomatose e leucemia bovina, têm sido utilizados para definir essa mesma enfermidade.

De acordo com BENDIXEN (apud BARROS e LEMOS, 1998), o complexo leucose bovina pode ser dividido em duas formas epidemiológicas distintas: a enzoótica e a esporádica.

A leucose bovina esporádica caracteriza-se pelo aparecimento de casos isolados, podendo apresentar-se sob três formas anatômicas: multicêntrica, tímica e cutânea, sendo que as duas primeiras ocorrem em animais ainda em fase juvenil e a terceira em animais adultos. Esse tipo de leucose acomete animais com idade inferior a três anos, não havendo evidência de que seja causada por um agente infeccioso (RADOSTITS et al., 2002).

SORENSEN (apud BARROS e LEMOS, 1998) aponta a leucose enzoótica bovina como sendo o tipo mais comum de leucose observado nos bovinos e ANDERSON et al. (apud BARROS e LEMOS, 1998) observa que sua maior incidência ocorre em animais entre 5 a 7 anos, apresentando-se sob a

forma anatômica multicêntrica com a possibilidade de ocorrência de infiltrações tumorais em vários órgãos (BARROS e LEMOS, 1998).

O agente causal da LEB é um vírus da família *Retroviridae*, denominado vírus da leucose bovina (VLB). Entretanto, é importante frisar que a infecção pelo VLB pode ou não apresentar manifestações clínicas, sendo estas determinadas também pela constituição genética do hospedeiro (RADOSTITS et al., 2002).

1.2.1 Histórico

As primeiras referências à leucose bovina, foram feitas na Alemanha, por Leisereing¹, em 1871. Em 1878, Siedamgrotsky elaborou a primeira descrição desta doença, mas foram Smith e Wolkman, em 1916, e Dutoit, no mesmo ano, que a descreveram com maior perfeição. Em 1934, Schottler levantou a questão da sua contagiosidade (FERREIRA, 1968).

A Europa é considerada o berço da leucose enzoótica bovina. Quando o número de casos de tumores leucóticos no oeste germânico cresceu acima dos níveis previstos após a II Guerra Mundial, extensivos estudos sobre essa enfermidade foram lá iniciados (JOHNSON e KANEENE, 1992).

Provavelmente, o gado europeu infectado com o VLB foi importado das regiões bálticas para os Estados Unidos no final do século XIX, já existindo antes da II Guerra Mundial, relatos sobre a presença da enfermidade neste país. Após a II Guerra Mundial sucederam-se outros, sugerindo que a leucose bovina era uma doença comum para esta época. A infecção difundiu-se no gado americano e também no canadense, apresentando atualmente alta prevalência em muitos rebanhos leiteiros nesses países. A exportação do gado infectado do Canadá e dos Estados Unidos para a Europa e para a América do Sul deve ter contribuído para a disseminação do VLB em outros países (JOHNSON & KANEENE, 1992).

¹ Leisereing, 1871 apud OLSON, C.; MILLER, J. M. History and terminology of enzootic bovine leukosis. In: BURNÝ, A., MAMMERICKX, M., eds. **Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus**. Boston, Martinus-Nijhoff, p. 3-11, 1987. Citados por: GARCIA et al., 1995.

1.2.2 Descoberta do Agente Etiológico

As primeiras investigações levaram a uma suspeita inicial de que a leucose bovina fosse uma doença infecciosa pela ocorrência de tumores em alguns rebanhos, mas não em outros. Em 1969, Wittmann e Urbanek obtiveram sucesso em um estudo experimental de indução de linfossarcoma em ovinos com material oriundo de linfossarcoma bovino. Uma importante descoberta surgiu no mesmo ano, quando Miller et al. relataram que os leucócitos de alguns bovinos, depois de cultivados entre 2 a 3 dias, produziram partículas virais semelhantes às partículas encontradas em células de outras espécies com leucemia. A partir dessa observação, o vírus foi isolado somente em vacas adultas com linfossarcoma, mas não no gado que apresentava a forma esporádica da leucose (forma juvenil e cutânea). Em rebanhos com casos múltiplos de leucose bovina, o vírus também foi isolado de todas as vacas com linfocitose persistente, embora não tenha sido isolado em rebanhos sem relatos da doença. Vários outros estudos seguiram-se, confirmando a transmissibilidade e o papel do VLB na leucose bovina. Anticorpos direcionados a esse vírus encontrados no gado infectado e o desenvolvimento de testes sorológicos subsequentes, permitindo uma investigação epidemiológica em larga escala na população bovina forneceram evidências suficientes para preencher a maior parte dos critérios virológicos e seroepidemiológicos necessários para o estabelecimento de uma relação causa-efeito entre um câncer e um vírus (JOHNSON & KANEENE, 1992).

1.2.3 Transmissão

Podem ser citados vários modos de transmissão horizontal do VLB, forma mais comum pela qual o vírus é disseminado sob condições naturais. A transmissão por contato direto ocorre por quaisquer meios pelos quais os linfócitos infectados pelo VLB possam ser transmitidos de uma vaca para outra,

havendo um risco aumentado de infecção no rebanho leiteiro durante o período periparturiente, sugerindo que as secreções vaginais, exsudatos e placentas das vacas, tanto quanto os instrumentos de parto contaminados podem servir como fontes de células sanguíneas infectadas (RADOSTITS et al., 2002). Alguns autores consideram o colostro como uma forma importante de transmissão, embora haja divergências em relação ao assunto, pois outros pesquisadores julgam que os anticorpos colostrais protegem os lactentes durante os primeiros meses de vida (BARROS e LEMOS, 1998). A transmissão pela inseminação artificial ainda não foi demonstrada, embora o sêmen contendo linfócitos infectados possa servir como fonte do vírus (RADOSTITS et al., 2002). A transmissão iatrogênica decorre do uso comum de instrumentos cirúrgicos, podendo ocorrer também por transfusões sanguíneas e pela aplicação de vacinas que contêm sangue. Agulhas para testes intradérmicos e agulhas comuns (onde esteja presente uma quantidade significativa de sangue infectado) bem como o uso de luvas contaminadas no exame retal constituem um grande risco de transmissão do vírus (RADOSTITS et al., 2002). Atualmente considera-se que a transmissão por insetos hematófagos possa ocorrer num ambiente onde o rebanho seja numeroso, com um grande percentual de animais infectados e uma alta população de insetos (BUXTON et al., apud BARROS e LEMOS, 1998).

A transmissão vertical do VLB, apontada como resultante da exposição transplacentária ao vírus durante a gestação, é relativamente infreqüente, pois menos de 20% dos filhos de vacas positivas já nascem infectados (van der MAATEN et al., apud BARROS e LEMOS, 1998).

1.2.4 Quadro Clínico

Há três respostas em relação à infecção pelo VLB:

- Resposta permanente de anticorpo, que corresponde à forma de infecção isolada;
- Resposta de anticorpo com linfocitose persistente (LP);

- Resposta de anticorpo com a presença de tumores, que é a fase terminal da infecção, envolvendo a transformação dos linfócitos B infectados (RADOSTITS et al., 2002).

O VLB, uma vez presente num animal, poderá permanecer apenas em estágio latente, sendo este animal um transmissor da doença sem apresentar, no entanto, LP e/ou tumores (linfossarcomas), cujo desenvolvimento é determinado pela constituição genética do hospedeiro (RADOSTITS et al., 2002).

São consideradas manifestações clínicas da LEB a LP, definida como um aumento benigno do número de linfócitos circulantes, e o linfossarcoma, que se caracteriza pelo desenvolvimento de tumores em vários locais do organismo, acarretando variação no quadro clínico (RADOSTITS et al., 2002).

O sinal clínico característico é o aumento de tamanho dos linfonodos superficiais, principalmente os pré-escapulares e os pré-crurais. Outros linfonodos que freqüentemente aparecem aumentados são os mamários e mandibulares. A grande variedade de outros sinais clínicos associados à enfermidade depende da localização das massas tumorais e das funções vitais que elas afetam (BARROS e LEMOS, 1998).

A freqüência aproximada com que os sinais clínicos aparecem é: 80 % de perda de peso; 77 % de redução na produção de leite; 58 % de linfadenopatia externa; 52 % de anorexia; 43 % de linfadenopatia interna; 41 % de paresia posterior; 23 % de febre; 14,3 % de comprometimento respiratório; 13,2 % de exoftalmia bilateral; 12,7 % de diarreia; 8,7 % de constipação; 7,4 % de exoftalmia unilateral e 7 % de comprometimento cardiovascular (RADOSTITS et al., 2002).

1.2.5 Prevalência

A LEB ocorre mundialmente, variando a prevalência da infecção entre os países. Estima-se que a infecção pelo VLB esteja pelo menos em 20 % na população de vacas leiteiras adultas dos Estados Unidos, 6 a 11 % no Canadá, 27 % na França, 37 % na Venezuela; no Reino Unido, a prevalência é baixa. Na

Nova Zelândia, estima-se que em cerca de 2 % dos rebanhos leiteiros o nível da infecção fique pelo menos em 5 a 10 %. Na Austrália, a prevalência da infecção no rebanho de corte é de 0,22 % (RADOSTITS et al., 2002).

No Brasil, a LEB foi descrita pela primeira vez em 1943, por Rangel e Machado², que estudaram a frequência de câncer em animais domésticos, em Minas Gerais. Porém, o primeiro registro oficial de um caso clínico da LEB no Brasil foi elaborado por Merckt et al. (1959), no estado do Rio Grande do Sul. (CAMARGOS, 2004). A partir da década de 70, a presença da LEB no rebanho de vários estados brasileiros tem sido registrada paulatinamente, como demonstra a tabela abaixo, onde é apontada a prevalência da infecção na população estudada.

TABELA 1 - A LEB NO BRASIL (**continua**)

DATA	AUTORIA	ESTADO	PREVALÊNCIA
1978	ALENCAR FILHO	SP	60,0 %
1979	ALENCAR FILHO et al.	SP	35,5 %
1980	LIMA et al.	SP	33,0 %
1980	LEITE et al.	MG	70,9 %
1980	SCARCI et al.	RS	19,0 %
1981	ROMERO & ROWE	RJ	53,25 %
1982	CUNHA et al.	RJ	26,99 %
1982	KANTEK et al.	PR	18,3 %
1983	KANTEK et al.	PR	20,7 %
1983	BIRGEL et al.	SP	53,8 %
1983	MODENA et al.	MG	12,5 %
1984	MODENA et al.	MG	26,69 %

² RANGEL, N. M. e MACHADO, A. V. Contribuição à Oncologia Comparada em Minas Gerais. *Arq. Esc. Sup. Vet. Minas Gerais* v.1, p. 84-96, 1943. Citado por: GARCIA et al., 1995.

TABELA 1 - A LEB NO BRASIL (conclusão)

1985	SANTOS et al.	MG	28,4 %
1985	GOMES et al.	RS	32,6 %
1988	BIRGEL et al.	SP	44,9 %
1988	FLORES et al.	RS	14,2 %
1990	FLORES et al.	RS	21,0 %
1990	TÁVORA	BA	16,1 %
1990	FLORES et al.	RS	20,7 %
1990	MODENA et al.	RO	23,0 %
1990	MODENA et al.	AC	9,7 %
1991	ANDRADE e ALMEIDA	GO	46,0 %
1991	BIRGEL et al.	SP	42,9 %
1991	MELO	PE	13,8 %
1994	ABREU et al.	CE	9,14 %
1994	BIRGEL et al.	SP	4,15 %
1995	BIRGEL JR. et al.	SP	49,2 %
1996	CARVALHO et al.	PR	7,0 %
1996	MORAES et al.	RS	12,0 %
1999	MOLNÁR et al.	PA	49,8 %
2001	SILVA e BIRGEL	PI	17,7 %
2003	MEGID et al.	SP	52 %
2003	CARNEIRO	AM	9,6 %

No Mato Grosso do Sul inexistem dados sobre a prevalência da infecção pelo VLB, embora a ocorrência de casos clínicos da forma multicêntrica do adulto evidencie a sua presença nesse estado (BARROS e LEMOS, 1998).

No Paraná, o primeiro registro da LEB data de 1980, quando DINIZ et al. confirmaram a presença da doença em bovinos de origem canadense por meio de exames clínicos e anátomo-patológicos.

Em 1982 comprovou-se a presença da infecção com o VLB em vacas leiteiras importadas do Uruguai por meio da detecção de anticorpos pela AGID

(KANTEK et al.). Estes mesmos autores, em 1983, indicaram uma prevalência de infecção pelo VLB de 20,7 % no rebanho bovino leiteiro do Paraná em 40,8 % das propriedades estudadas.

Mais recentemente, em 1996, CARVALHO et al. determinaram a prevalência da infecção pelo VLB em bovinos da raça HPB e Nelore na região de Londrina. Considerando as duas raças pesquisadas, a prevalência foi de 7,0 % em 35,7 % das propriedades avaliadas. Como não foram encontrados animais sororeagentes ao VLB nos rebanhos da raça Nelore, a prevalência da infecção, considerando apenas a raça HPB, foi de 18,4 %.

Com relação à forma tumoral da doença, há um relato atual realizado por OLLHOFF et al. (2003), cuja infecção pelo VLB foi confirmada no Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) pela técnica da PCR.

1.2.6 Aspectos Econômicos e Sanitários

As perdas econômicas causadas pela LEB são muito significativas, principalmente quando associadas a custos de controle e programas de erradicação. Há muitos anos a Comunidade Européia vem sustentando uma campanha de erradicação da LEB (RADOSTITS et al., 2002).

Tais perdas econômicas estão associadas aos seguintes fatores:

- Mortalidade decorrente do linfossarcoma (na Europa, a mortalidade de bovinos causada pela leucose bovina atinge uma taxa de 5% ao ano³);
- Condenação de carcaças em abatedouros;
- Restrição à exportação de bovinos e sêmen;
- Diminuição na produção de leite (REINHARDT et al., 1988);
- Queda do desempenho reprodutivo;
- Custos decorrentes da reposição do gado perdido ou abatido precocemente;

³ BLOOD & HENDERSON, 1969, apud DINIZ et al. *Leucose Bovina no Estado do Paraná*. Revista do Setor de Ciências Agrárias, v. 2, 1980.

- Aumento da suscetibilidade do gado infectado a outras doenças infecciosas (FERRER, 1980), fato também observado por GARCIA et al., 1995, que relataram certa predisposição dos animais infectados à mastite bovina.

Acredita-se que as perdas anuais nos Estados Unidos, atribuídas à leucose que acomete o gado leiteiro, alcancem a cifra de 42 milhões de dólares (DA et al., 1993, apud CAMARGOS, 2004).

Além dos prejuízos econômicos relacionados à doença, a leucose bovina apresenta também um enfoque em saúde pública. Apesar de não ser uma zoonose, alguns pesquisadores consideram a possibilidade de que o gado bovino leucótico possa servir como reservatório de um vírus potencialmente leucemogênico para o ser humano (FERRER, 1980).

Sabe-se que partículas virais têm sido detectadas no leite de vacas infectadas e o grau de contato entre humanos e o gado doméstico é outro fator que aumenta o risco de transmissibilidade do VLB. A identificação de anticorpos contra o HTLV - tipo 1 no soro e no fluido espinhal de pacientes com esclerose múltipla promoveu especulações sobre o envolvimento do VLB nesta doença. (CUNNINGHAM apud JOHNSON e KANEENE, 1992)⁴

Recentemente, por meio de imunoblot utilizando a proteína do capsídeo p24, testou-se 257 soros humanos. Destes, 74 % apresentaram pelo menos um anticorpo isotipo reativo com o VLB. A especificidade dessa reação foi demonstrada por estudos de competição e pela exclusão de reação cruzada com outros vírus crônicos humanos. Estes resultados não significam, necessariamente, que realmente haja infecção humana com o VLB; os anticorpos poderiam ser uma resposta a antígenos do VLB desnaturados pelo calor e presentes nos alimentos consumidos. Porém, eles sugerem que outros estudos nessa área poderiam ser importantes (BUEHRING apud CAMARGOS, 2004).

⁴ CUNNINGHAM, A. S. *Bovine leukaemia virus and multiple sclerosis*. Nature, UK 320, 219, 1986.

1.2.7 Prevenção e Controle

A leucose enzoótica bovina é uma doença para a qual não existe tratamento, sendo possível apenas prevenir e/ou controlar (RADOSTITS et al., 2002).

O princípio fundamental para prevenir a difusão da LEB é a identificação dos animais infectados e sua eliminação ou segregação do plantel, dependendo da prevalência da enfermidade no rebanho (BARROS e LEMOS, 1998).

Programas de controle baseados em tal princípio requerem testes periódicos de diagnóstico. Esses programas foram adotados por vários países europeus, os quais exigem certificado de negatividade para o gado importado, como a Dinamarca e a Alemanha. Em outros países, incluindo o Canadá e os Estados Unidos, os programas de controle da LEB não são oficiais, ocorrendo de forma voluntária (FENNER et al., 1993).

Considera-se um rebanho positivo aquele que apresentar um único animal soropositivo, devendo a totalidade dos animais ser testada. Os animais infectados podem ser substituídos por outros animais pertencentes a rebanhos livres da infecção ou por descendentes soronegativos do próprio rebanho, onde devem ser formados plantéis de novilhas não-reagentes para reposição (BARROS e LEMOS, 1998).

Certos procedimentos para minimizar a transmissão por meio de sangue contaminado devem ser adotados concomitantemente a essa identificação, eliminação e substituição de animais reagentes. Entre eles pode-se citar:

- Desinfecção de instrumentos cirúrgicos, de instrumentos para tatuagem e colocação de brincos, do descornador e de agulhas;
- Utilização de luvas descartáveis individuais para palpação retal ou desinfecção das mesmas;
- Manter isolados, doadores negativos para o VLB no rebanho, a fim de utilizá-los em procedimentos de transfusão e/ou premunicação. (BARROS e FLORES, apud BARROS e LEMOS, 1998).

A imunização artificial não induz a formação de anticorpos em níveis adequados, sendo pouco provável que as vacinas sejam efetivas para prevenir ou interromper a infecção (BARROS e LEMOS, 1998).

1.3 O AGENTE ETIOLÓGICO DA LEB

1.3.1 A Família *Retroviridae*

O VLB está incluído na família *Retroviridae*, que compreende, em primeiro lugar, diversos vírus de vertebrados, embora sejam encontrados também em outros animais como insetos e moluscos (FIELDS, 1996).

A denominação “*retro*”, significando reverso, deriva da enzima transcriptase reversa, que é uma DNA polimerase dependente de RNA, encontrada no interior dos virions de todos os membros da família (FENNER, 1993).

Nenhum outro grupo de agentes infecciosos tem recebido recentemente tanta atenção dos cientistas como os retrovírus. A intensa investigação sobre essa família de vírus reflete não somente sua importância enquanto patógenos de animais e de seres humanos, mas também seu marcante valor experimental, o qual é uma consequência de sua associação íntima com o hospedeiro (FIELDS, 1996).

Tanto natural quanto experimentalmente, os retrovírus associam-se a várias doenças, incluindo neoplasias malignas de manifestação em curto ou longo prazo, enfermidades debilitantes, desordens neurológicas e imunodeficiências. A infecção por retrovírus pode também levar a uma viremia por toda a vida, porém sem quaisquer efeitos óbvios da presença de uma doença (FIELDS, 1996).

Apesar da ampla variedade de espécies hospedeiras e das diferentes interações que apresentam com as mesmas, todos os retrovírus são bastante similares quanto à estrutura, organização genômica e modo de replicação (FIELDS, 1996).

O virion dos retrovírus é esférico e envelopado, com cerca de 80 a 130 nm de diâmetro (FENNER, 1993), exibindo em sua superfície estruturas proeminentes compostas por um multímero de 2 subunidades protéicas, produtos do gene *env* (FIELDS, 1996). Internamente apresenta um capsídeo icosaédrico (FENNER, 1993), formado por 3 ou 4 produtos do gene *gag* (FIELDS, 1996). O core é constituído pelo complexo genoma-nucleoproteína (FENNER, 1993), além de incluir diversas proteínas que apresentam importantes funções catalíticas durante a replicação viral, abrangendo uma protease codificada pelo gene *pro* e 2 produtos do gene *pol*, sendo eles a transcriptase reversa que, por meio de suas muitas atividades enzimáticas, permite a conversão da informação genética contida em uma fita simples de RNA a uma fita dupla de DNA e a integrase, necessária na ligação covalente do DNA contendo o código genético viral ao DNA da célula hospedeira para formar o provírus (FIELDS, 1996).

O genoma retroviral consiste em 2 moléculas, geralmente idênticas, de RNA fita simples (FIELDS, 1996). Cada segmento haplóide do genoma é linear, apresentando cadeia com polaridade positiva contendo, aproximadamente, de 7.000 a 10.000 nucleotídeos (FENNER, 1993) e incluindo *cap* e cauda poliadenilada nas extremidades 5' e 3', respectivamente (FIELDS, 1996).

A ordem dos genes codificadores das proteínas estruturais dos retrovírus é invariavelmente *gag-pro-pol-env*. Outros genes, envolvidos na regulação da expressão viral, estão presentes em alguns grupos de retrovírus que são denominados complexos (FIELDS, 1996), como é o caso do VLB.

O genoma dos retrovírus apresenta algumas particularidades que não são observadas em nenhuma outra família de vírus:

- É o único genoma diplóide;
- É o único RNA viral que é sintetizado e processado pela maquinaria da célula hospedeira;
- É o único genoma que se associa a um RNA de transferência específico, cuja função é iniciar sua replicação;
- É o único genoma RNA fita simples com polaridade positiva que não atua como RNA mensageiro logo após a infecção (FENNER, 1993).

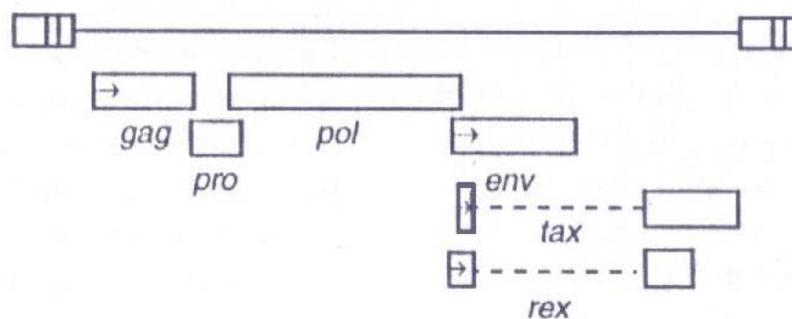
A subdivisão da família *Retroviridae* em 7 gêneros tem como critério a relação entre a seqüência dos nucleotídeos e a estrutura genômica (FIELDS, 1996). Apenas 2 gêneros apresentam nomes oficiais: os Lentivírus e os Spumavírus. Os gêneros (grupos) não nomeados incluem: os retrovírus de mamíferos tipo B, os retrovírus de mamíferos tipo C, os retrovírus aviários tipo C, os retrovírus de mamíferos tipo D e os retrovírus semelhantes ao vírus da leucose bovina (BLV, sigla em inglês) e ao vírus humano da leucemia de células T, HTLV (FENNER, 1993).

1.3.2 O Grupo HTLV-BLV

Este grupo compreende vírus exógenos associados, na espécie humana, ao linfoma de células T, bem como a algumas doenças neurológicas e, no gado bovino, ao linfoma de células B, desconhecendo-se que contenha vírus endógenos ou que apresentem oncogenes (FIELDS, 1996).

Conforme mostra a figura 1 (FIELDS, 1996), além dos genes que codificam as proteínas estruturais (*gag*, *pro*, *pol* e *env*), os vírus do grupo HTLV-BLV contêm genes codificadores de proteínas não estruturais (*tax* e *rex*), que são importantes na expressão gênica, sendo portanto classificados como retrovírus complexos (FIELDS, 1996).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DO GENOMA DO GRUPO HTLV-BLV



Os vírus compreendidos nesse grupo apresentam uma longa região entre *env* e U_3 , que codifica duas proteínas em fases abertas de leitura sobrepostas ORFs (“open reading frame”). Originalmente, essa região foi denominada X ou *lor* (“long open reading frame”). Ambos os genes são traduzidos de RNAs mensageiros obtidos por “splicing”, contendo o códon de iniciação e poucos códons adicionais do gene *env*. Como o nome sugere, a proteína codificada pelo gene *tax* é um transativador viral derivado da região X. A presença desta proteína com P.M. de 40.000 daltons é necessária para a expressão viral desse grupo. O gene *rex*, cujo nome deriva de um regulador da região X, codifica uma proteína de aproximadamente 27.000 daltons, sendo essencial para a expressão de todo o RNA mensageiro e do RNA mensageiro originário do gene *env*. Em sua ausência, somente os RNAs mensageiros codificadores de *tax* e *rex* são encontrados nas células infectadas (FIELDS, 1996).

1.3.3 O VLB

Conforme mencionado acima, o VLB é um retrovírus exógeno relacionado estrutural e funcionalmente aos vírus humanos da leucemia de células T tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). As principais células-alvo do VLB são os linfócitos B. A partícula viral consiste fundamentalmente de 2 moléculas idênticas de RNA fita simples, nucleoproteína p12, proteína do capsídeo p24, glicoproteína transmembrana gp30, glicoproteína do envelope gp51 e várias enzimas, incluindo a transcriptase reversa. O DNA proviral do VLB é gerado pela transcrição reversa de grande parte do genoma viral e integra-se aleatoriamente no DNA nuclear da célula hospedeira, onde permanece, porém não se constatando a presença de vírus livre *in vivo*. Quando células infectadas são cultivadas *in vitro*, geralmente pelo co-cultivo de linfócitos e uma linhagem celular indicadora, partículas virais infecciosas são produzidas, inclusive, mais prontamente por meio da estimulação com mitógenos (MANUAL OIE,2000).

1.4 O DIAGNÓSTICO DA LEB

Um diagnóstico *ante-mortem* definitivo da LEB depende do exame clínico-patológico do animal. A seleção apropriada das várias técnicas diagnósticas disponíveis é importante considerando-se a fase da doença:

- Técnicas sorológicas e virológicas para o diagnóstico da infecção viral;
- Exame hematológico para identificar a linfocitose persistente;
- Exame histológico de amostras de biópsia para identificar os tumores neoplásicos (RADOSTITS et al., 2002).

1.4.1 Diagnóstico da Infecção com o VLB

Com a demonstração da presença do patógeno ou de seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos do hospedeiro, obtém-se o diagnóstico de certeza de um processo infeccioso (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

1.4.1.1 Testes sorológicos

Testes padronizados para a pesquisa de anticorpos específicos são valiosos na definição da suspeita clínica principal (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Os testes sorológicos podem utilizar reagentes não-marcados, os quais possuem sensibilidade de detecção menor pela necessidade de formação de grandes complexos antígeno-anticorpo, ou reagentes marcados, que amplificam o sinal, aumentando a sensibilidade de detecção (FERREIRA e ÁVILA, 2001).

Várias técnicas sorológicas foram adaptadas para detectar anticorpos direcionados ao VLB (FERRER, 1980), sendo descritas a seguir as mais comumente utilizadas:

Imunofluorescência - a técnica de imunofluorescência indireta foi padronizada para a detecção de anticorpos do VLB no gado bovino, usando células-alvo obtidas de culturas contínuas de células bovinas leucêmicas (NBC cell lines)

estabelecidas de linfócitos de bovinos com linfossarcoma histologicamente confirmado (FERRER, 1980).

Radioimunoensaio - os antígenos p24 e gp51 do VLB foram empregados na técnica de radioimunoensaio que foi utilizada em estudos epidemiológicos. É considerado um dos testes diagnósticos mais sensíveis e o mais apropriado para a detecção de anticorpos do VLB em infecções recentes, em amostras de leite e no soro de fêmeas no período periparturiente. Porém, esta técnica exige equipamentos laboratoriais de alto custo e pessoal técnico especializado; portanto, o teste de AGID permanece como o teste sorológico oficial para o diagnóstico da infecção pelo VLB (JOHNSON & KANEENE, 1992).

Virusneutralização - o teste de virusneutralização é baseado na habilidade dos anticorpos de inibir especificamente a indução sincicial de uma preparação de VLB livre de células. Embora seja altamente sensível, requer o uso de técnicas de cultivo celular e um período de incubação de 5 a 7 dias (FERRER, 1980).

Fixação de Complemento - em relação à AGID para detecção de anticorpos direcionados ao antígeno glicoprotéico, o teste de fixação de complemento pareceu ser menos sensível. Outra desvantagem é que muitas amostras de soros de bovinos apresentam atividade anticomplementar, particularmente quando colhidas sem o devido cuidado (FERRER, 1980).

Teste de inibição sincicial - este teste baseia-se na inibição dos efeitos citopáticos produzidos pelo VLB em linhagens celulares indicadoras (célula linfoblástica B humana - Raji) mediada por anticorpos específicos. A linhagem celular FLK, persistentemente infectada com o VLB, é submetida à pré-incubação com as amostras-teste, seguindo-se do co-cultivo da mesma com as células indicadoras anteriormente citadas (JOHNSON et al. apud CAMARGOS, 2004).

Imunoblot - método simples capaz de informar o “status” de infecção em animais que apresentaram resultados sorológicos indeterminados pelas técnicas de AGID ou ELISA. O imunoblot, utilizando a p24 como antígeno, tem sido considerado o teste sorológico confirmatório mais adequado. Este teste apresenta como desvantagens a dificuldade em se preparar lotes reprodutíveis de antígeno e o fato de ser uma técnica bastante trabalhosa (KITTELBERGER et al., BICKA et al., CHOI et al. apud CAMARGOS, 2004).

Teste de AGID - é um teste específico, mas não muito sensível, utilizado para a detecção de anticorpos em amostras individuais de soro ou plasma sanguíneo, não sendo adequado para amostras de leite, pela perda de especificidade e de sensibilidade. Já foi comprovado que a utilização deste teste é eficiente para esquemas de erradicação da doença, sendo também considerado o teste de referência oficial da OIE e da Comunidade Européia para testar animais importados (MANUAL OIE,2000).

Teste ELISA - segundo RADOSTITS (2002), trata-se do mais sensível dos testes sorológicos, podendo ser utilizado em amostras séricas agrupadas, permitindo a detecção de anticorpos nos rebanhos com prevalência inferior a 1%. O teste ELISA supera o teste de AGID em sensibilidade, pois este último permite identificar a presença da infecção pelo VLB em apenas 50% dos rebanhos, se comparado àquele. Outra vantagem em relação à AGID é que o teste ELISA também pode ser empregado para analisar amostras individuais ou agrupadas de leite. Considerando estas últimas, o teste ELISA é útil quanto à identificação dos rebanhos negativos para a infecção pelo VLB, pois aqueles identificados como positivos necessitam de testes adicionais individuais ou coletivos, para que se possa estabelecer definitivamente sua condição a cerca dessa infecção. A Suécia é um país que busca a erradicação da infecção pelo VLB fazendo uso do ELISA em amostras agrupadas de leite. A OIE prescreve o teste ELISA para uso no comércio internacional.

1.4.1.2 Detecção do vírus

Isolamento viral - Células mononucleares do sangue total do animal suspeito são separadas por centrifugação em gradiente de densidade e posteriormente cultivadas isoladamente ou co-cultivadas com células de pulmão de feto bovino (FBL) durante um período de 3 a 4 dias. Em caso positivo, os antígenos virais p24 e gp51 podem ser detectados no sobrenadante das culturas por radioimunoensaio, ELISA, AGID ou Imunoblot, bem como a presença de partículas do VLB pode ser demonstrada pela microscopia eletrônica (MANUAL OIE,2000).

Bioensaio em ovinos - A inoculação de material suspeito em ovinos é usada algumas vezes para a detecção viral como alternativa à cultura celular. Nesse caso, a infecção é confirmada pela detecção de anticorpos específicos depois de seis semanas (MANUAL OIE,2000).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - Este é um teste sensível e específico para o diagnóstico direto da infecção pelo VLB, mesmo antes de os anticorpos estarem presentes. Quando a prevalência da infecção é menor que 5%, a PCR é mais sensível do que os testes de AGID e ELISA em detectar os bovinos infectados. Essa técnica é bastante útil na diferenciação dos bezerros não-infectados que apresentam anticorpos colostrais dos bezerros realmente infectados pelo VLB, bem como na seleção de bovinos doadores de sangue total para premunicação. No entanto, para evitar os resultados falso-positivos devido à contaminação de amostras com o produto da PCR, seu uso requer rigorosas precauções (RADOSTITS, 2002). Vários pesquisadores em diversos locais do mundo têm referenciado a PCR para detectar o DNA proviral do VLB (NAIF et al., 1990 na Austrália; MURTAUGH et al., 1991 nos Estados Unidos; JACOBS et al., 1992 no Canadá; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1992 na Suécia; AGRETI et al., 1993 na Itália; KELLY et al., 1993 nos Estados Unidos; KLINTEVALL et

al., 1994 na Suécia; EAVES et al., 1994 na Austrália; FECHNER et al., 1996 na Alemanha; XIE et al., 1997 no Japão; CAMARGOS et al., 2003 no Brasil).

1.4.2 Diagnóstico de Linfocitose Persistente (LP)

A LP é um aumento na contagem absoluta dos linfócitos circulantes, sendo que aproximadamente 30% dos animais infectados pelo VLB a desenvolvem. Inicialmente, ela foi considerada uma expressão subclínica do estágio tumoral da doença, tornando-se importante critério diagnóstico nos programas de controle da mesma. No entanto, após o desenvolvimento de testes sorológicos sensíveis, tornou-se possível examinar criticamente o valor da LP como um instrumento incompleto de diagnóstico da infecção pelo VLB (RADOSTITS, 2002).

A maioria das células envolvidas na LP é constituída de linfócitos normais, mas formas atípicas e anormais têm sido descritas. Um aumento da porcentagem de linfócitos no leucograma total de 50% a 65% do normal é considerado um resultado positivo. A LP pode desaparecer nos animais que desenvolvem subseqüentemente linfossarcoma (RADOSTITS, 2002).

1.4.3 Diagnóstico do Linfossarcoma

O diagnóstico do linfossarcoma é realizado por meio de exame histopatológico de um fragmento de material tumoral obtido por biópsia ou necrópsia ou pelo exame do aspirado de linfonodo periférico infartado. As células dos linfonodos ou os leucócitos do sangue periférico dos animais acometidos pelo linfossarcoma podem apresentar alterações cromossômicas (RADOSTITS, 2002).

À necrópsia, os órgãos que se mostram freqüentemente envolvidos nos animais adultos são: o coração, o abomaso e a medula espinhal. No coração as massas tumorais invadem particularmente o átrio direito. A parede abomasal, quando envolvida, revela espessamento irregular com material tumoral na

submucosa, particularmente na região pilórica. Lesões similares ocorrem na parede intestinal, sendo que ulcerações profundas na área acometida são comuns. O envolvimento do sistema nervoso geralmente inclui o espessamento dos nervos periféricos. Os linfonodos acometidos podem apresentar intenso aumento de volume, podendo ser compostos de tecidos normais e neoplásicos. É importante lembrar que o linfossarcoma pode apresentar-se como massas nodulares discretas, bem como infiltrado tecidual difuso, sendo este último, muitas vezes, erroneamente interpretado como alteração degenerativa (RADOSTITS, 2002).

É importante lembrar que a LEB não pode ser distinguida da leucose bovina esporádica por meio do exame histopatológico (RADOSTITS, 2002).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DAS CÉLULAS FLK-BLV

Para a preparação dos dois componentes do kit para o diagnóstico da LEB por meio da técnica de AGID, antígeno e soro específico, utilizou-se como matéria-prima a suspensão viral obtida pela colheita do meio de cultivo da linhagem celular FLK-BLV, sendo a mesma cronicamente infectada pelo VLB. Também o antígeno utilizado no teste ELISA foi preparado a partir desse material, conforme descrito no tópico 2.8.

A linhagem FLK-BLV foi desenvolvida por VAN DER MAATEN, MILLER e BOOTHE em 1974, tendo sido trazida para o Brasil no final dos anos 70 pelo Dr. Carlos Hipólito Romero Mercado, médico veterinário que praticamente iniciou os trabalhos de diagnóstico sorológico da LEB, o que muito contribuiu para os estudos sobre essa enfermidade no país.

No presente estudo foram utilizadas células FLK-BLV gentilmente cedidas por pesquisadores da EMBRAPA de Concórdia, no Estado de Santa Catarina, um dos locais onde o Dr. Romero trabalhou quando esteve no Brasil.

Inicialmente, procedeu-se o cultivo das células FLK-BLV para a formação de um estoque das mesmas, onde vários criotubos, contendo células apresentando baixo número de repiques, foram congelados em nitrogênio líquido. Os procedimentos para o congelamento e estocagem das células FLK-BLV encontram-se descritos no anexo 2, na parte final dessa tese.

Esse banco de células permitiu um processo de produção descontínuo, possibilitando a expansão celular de modo padronizado e também a elaboração de cada novo lote de antígeno com células de boa qualidade.

O processo de obtenção da matéria-prima envolveu o cultivo das células FLK-BLV em larga escala e seguiu as etapas enumeradas a seguir, sendo importante salientar que todo o material utilizado na cultura celular foi devidamente esterilizado, bem como os procedimentos executados em cabine com fluxo laminar.

1. Retirada de um criotubo, contendo as células em questão, do botijão de nitrogênio líquido.
2. Imersão de parte do criotubo em banho-maria, à temperatura de 37 °C para descongelamento rápido das células.
3. Transferência do conteúdo total, aproximadamente 1 mL, para um tubo de centrífuga contendo meio de crescimento (MC).

Observação: as soluções e meios utilizados no cultivo das células FLK-BLV foram detalhados no anexo 1, no final da tese.

4. Centrifugação em centrífuga clínica, da marca MediSpin[®] IEC, a 1.228 X g (3.100 rpm) durante 5 minutos, para a formação do sedimento celular.
5. Descarte do meio sobrenadante para a retirada do DMSO, constituinte do meio de congelamento celular (MCC), porém extremamente tóxico para as células em cultura.
6. Suspensão do sedimento celular com MC.
7. As células em suspensão foram semeadas em garrafa descartável da marca Corning para cultivo celular com 25 cm² de superfície.
8. A cultura foi mantida em estufa comum a 37 °C, sendo avaliada microscopicamente até a formação completa da monocamada celular, aproximadamente 48 horas após o início do processo de incubação.
9. Estando a monocamada de células “fechada”, procedeu-se o repique ou subcultura celular, conforme a seqüência descrita abaixo:
 - a) Descarte do meio de cultivo.
 - b) Adição de um volume de 5 mL de PBS para a lavagem da monocamada celular, objetivando-se a retirada do meio de cultivo excedente, descartado juntamente com o PBS. Esse procedimento tem a finalidade de minimizar a presença do SFB contido no meio de cultivo, o qual prejudicaria a etapa posterior descrita no item c a seguir.
 - c) Adição de 0,5 mL de TVS e incubação em estufa comum a 37 °C durante 5 a 15 minutos, a fim de possibilitar, pela ação da tripsina, o descolamento das células da superfície interna da garrafa, permanecendo as mesmas, após esse procedimento, suspensas em pequenos grumos na solução.

d) Adição de, no mínimo, 4,5 mL de MC e suspensão das células com pipeta, possibilitando, dessa forma, a neutralização da ação da tripsina pelo SFB presente no meio, bem como a dissolução dos grumos celulares, respectivamente.

e) Volumes idênticos, equivalentes à metade do volume total da suspensão de células, foram semeados em duas garrafas de 25 cm² de superfície, caracterizando uma expansão celular em progressão geométrica.

10. O processo de repique celular foi realizado conforme acima descrito, por vezes consecutivas, até a obtenção de dez garrafas com 150 cm² de superfície, permitindo a colheita diária de 200 mL de matéria-prima. Além das garrafas de 25 cm² e de 150 cm², foram utilizadas também garrafas intermediárias com 75 cm² de superfície no processo de expansão celular. Segue abaixo a Tabela 2 com os volumes das soluções e do meio utilizados para cada garrafa em questão.

TABELA 2 - VOLUME DE PBS, TVS E MC UTILIZADO EM CADA GARRAFA DE CULTIVO CELULAR

GARRAFA	PBS	TVS	MC
25 cm ²	5 mL	0,5 mL	6 mL
75 cm ²	10 mL	1,5 mL	10 mL
150 cm ²	20 mL	3 mL	20 mL

2.2 OBTENÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

2.2.1 Colheita da Matéria-Prima

Após a completa formação das monocamadas de células, das dez garrafas com 150 cm² de superfície, obtidas através da subcultura celular, o MC foi substituído por igual volume, 20 mL, de meio de manutenção (MM) com menor proporção de SFB, a fim de se evitar o descolamento das células, preservando-as em cultura por um maior período de tempo.

As células foram novamente incubadas em estufa comum a 37 °C durante 24 horas, período após o qual o MM foi cuidadosamente retirado e substituído por MM fresco previamente aquecido em banho maria a 37 °C. Esse

procedimento foi repetido a cada 24 horas por mais 4 dias, período em que se inicia o descolamento das células da monocamada.

O MM, colhido diariamente das garrafas, foi armazenado a 4 °C em um único frasco. No período de uma semana, utilizando-se dez garrafas de 150 cm² de superfície, cada uma com 20 mL de MM, foi possível colher 1 L de suspensão viral.

2.2.2 Preparação da Matéria-Prima

O MM foi congelado a 70 °C negativos e descongelado à temperatura ambiente. O procedimento de congelamento e descongelamento foi repetido mais uma vez, com o intuito de romper as células que descolaram da monocamada, presentes no meio, liberando as partículas virais nelas inclusas e proporcionando um aumento do título viral na suspensão colhida.

Para a retirada dos fragmentos celulares presentes, a suspensão viral foi clarificada em centrífuga refrigerada (marca Sorvall, modelo RC 5B Plus), a 9.715 X g (8.000 rpm), durante 20 minutos.

2.2.3 Análise da Matéria-Prima

Após a clarificação, colheu-se 10 mL da suspensão viral para a realização dos testes microbiológicos de viabilidade da matéria-prima. Essa alíquota foi mantida a 4 °C, enquanto o restante da suspensão foi novamente congelado a 70 °C negativos, para posterior processamento.

2.2.3.1 Pesquisa de bactérias na matéria-prima

A presença de bactérias, aeróbias e anaeróbias, na matéria-prima foi analisada por meio da inoculação em duplicata de 1 mL da suspensão viral em tubos de ensaio contendo meio de tioglicolato (TIO), os quais foram mantidos em estufa a 37 °C, por um período de 15 dias. Um tubo contendo somente meio TIO

foi incubado nas mesmas condições dos tubos semeados, como controle negativo. Avaliou-se os tubos diariamente até o término do período de incubação, considerando-se como resultado negativo a ausência de turvação em ambos os tubos inoculados com a suspensão viral.

2.2.3.2 Pesquisa de fungos na matéria-prima

Foi realizada a pesquisa de fungos na matéria-prima, semeando-se em duplicata 1 mL da suspensão viral em tubos contendo caldo de soja tripticaseína (CAS), que foram mantidos por 30 dias em temperatura ambiente. Como controle negativo, incubou-se um tubo contendo apenas caldo CAS em condições idênticas aos tubos inoculados. Diariamente, os tubos foram analisados quanto à presença de turvação, até o 30º dia após a inoculação. Avaliou-se o resultado de maneira idêntica àquele considerado para a pesquisa de bactérias na matéria-prima.

Observação: o MM e os meios utilizados para a análise da matéria-prima foram apresentados no anexo 3.

2.3 PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO

Não havendo a presença de bactérias e de fungos na matéria-prima para a elaboração do antígeno para o teste de AGID, a suspensão viral clarificada, que é a própria matéria-prima, tendo sido mantida congelada a -70 °C para posterior utilização, foi descongelada à temperatura ambiente e processada conforme a seqüência descrita a seguir:

- a) Adição de sulfato de amônia granular à taxa de 30 %, ou seja, 30 g para cada 100 mL de matéria-prima.
- b) Homogeneização em agitador magnético sob refrigeração a 4 °C durante um período de aproximadamente 12 horas.
- c) Centrifugação refrigerada a 1.000 X g durante 1 hora e descarte do sobrenadante após o procedimento.

- d) Suspensão do precipitado em água destilada, completando 1/10 do volume original da matéria-prima.
- e) Permanência do precipitado suspenso em água em repouso, durante um período de aproximadamente 12 horas, sob refrigeração a 4 °C.
- f) Centrifugação refrigerada a 1.000 X g durante 30 minutos, colheita do sobrenadante e descarte do precipitado após o procedimento.
- g) Diálise a 4 °C do sobrenadante contra PBS na proporção de 1:1000, para retirada do sulfato de amônia.
- h) Concentração do sobrenadante dialisado por ultrafiltração a um volume equivalente a 1/100 do volume original da matéria-prima, utilizando o sistema Amicon contendo membrana com P.M. de 30.000 daltons (concentrador por centrifugação Centriprep - 30).

Observação: consta, no anexo 4, a descrição do processo de concentração por ultrafiltração, utilizando o Centriprep - 30.

- i) Centrifugação refrigerada a 30.000 X g durante 1 hora e colheita do sobrenadante, o qual contém dois antígenos do VLB, a gp51 e a p24, constituintes do envelope e do capsídeo virais, respectivamente. O sedimento obtido a partir dessa centrifugação foi descartado.
- j) Congelamento da preparação acima obtida a 20 °C negativos, para posterior padronização da AGID com soro específico contendo anticorpos direcionados ao VLB e também com soros de referência, gentilmente cedidos pelo Dr. Dagmar Beier do Institute für Epidemiologische Diagnostik, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, que é o laboratório nacional de referência para a LEB na Alemanha, como também um dos laboratórios de referência para a LEB da OIE.

Observação: no kit para o diagnóstico da LEB pela AGID, denominou-se apenas de “antígeno” o produto cuja elaboração foi descrita nos itens acima.

2.4 PURIFICAÇÃO DO VLB

A purificação do VLB em gradiente de sacarose foi necessária para a obtenção do outro componente do kit para o diagnóstico da LEB pela técnica de AGID, ou seja, o soro específico.

Para tal, utilizou-se também, como matéria-prima, a suspensão viral proveniente da colheita do meio de cultivo das células FLK-BLV, cuja obtenção foi descrita acima, no tópico 2.2.

Após seu descongelamento à temperatura ambiente, a matéria-prima previamente testada para a presença de organismos contaminantes foi processada de acordo com as etapas abaixo:

- a) Adição de polietilenoglicol 8.000 na proporção de 7 % (peso/volume) e de cloreto de sódio a 2,3 %, ou seja, 7 g e 2,3 g para cada 100 mL da matéria-prima. Utilizou-se 10 mL de matéria-prima.
- b) Homogeneização em agitador magnético, sob refrigeração a 4 °C, durante um período de 4 horas.
- c) Centrifugação, sob refrigeração, a 11.952 X g (10.000 rpm) durante 30 minutos.

Durante o período de centrifugação, preparou-se um gradiente descontínuo de sacarose em um tubo específico para ultracentrífuga, adicionando-se ao mesmo 2 mL de solução de sacarose a 60 % e 3 mL de solução de sacarose a 30 %, ambas em tampão TNE pH 8,0.

Observação: detalhou-se, no anexo 5, os tampões e as soluções utilizados na purificação do VLB.

- d) Descarte cuidadoso do sobrenadante após o procedimento da centrifugação, permanecendo o sedimento ao longo da parede do tubo, sendo o mesmo suspenso em tampão STE, completando 1/2 do volume original da matéria-prima, ou seja, 5 mL.
- e) Transferência do sedimento suspenso em tampão STE ao tubo onde se preparou o gradiente descontínuo de sacarose, sobre a solução de 30 %, a qual ficou na parte superior do tubo.

f) Centrifugação, sob refrigeração, em ultracentrífuga (marca Hitachi, modelo SCP 85 H2, com rotor RPS40T), a 270.000 X g, durante 2 horas.

Observação: houve a formação de uma banda única de vírus de aproximadamente 1 mL de volume na interfase das duas concentrações de sacarose.

g) Remoção cuidadosa da banda viral com pipeta de Pasteur e armazenamento desse material, o VLB purificado, em dois criotubos.

h) Congelamento a 70 °C negativos.

2.5 OBTENÇÃO DO SORO ESPECÍFICO

Para a obtenção do soro específico, contendo anticorpos direcionados ao VLB, utilizou-se o VLB purificado em gradiente de sacarose, cujo processo de purificação foi descrito no tópico 2.4.

Após o descongelamento de um dos criotubos contendo o VLB purificado e a mensuração do seu volume, adicionou-se, nessa preparação, PBS suficiente para completar 10 mL. Essa suspensão foi mantida sob refrigeração, procedendo-se, dentro de um período de aproximadamente 1 hora, a inoculação em um animal da espécie ovina, pertencente à Divisão de Biotério da unidade Araucária do TECPAR.

Selecionou-se, para essa etapa do experimento, um animal devidamente identificado através de brinco numerado, com aproximadamente 40 kg de peso, mestiço da raça suffolk, com idade em torno de 2 anos, fêmea.

Inicialmente, realizou-se a colheita de sangue pré-infecção do animal acima descrito, conforme relatado a seguir: após a contenção e assepsia adequadas, puncionou-se a veia jugular, utilizando-se agulha descartável estéril 40X12,0 (18GX1.1/2") e seringa de 5 mL. Retirou-se a agulha do vaso, desconectando-se a mesma da seringa e transferindo-se o sangue para um tubo da marca "Vacuette" contendo EDTA (sal dissódico do ácido EtilenoDiaminoTetrAcético) em pó para um volume de 4 mL de amostra. O sistema de vácuo do tubo não foi utilizado, sendo que o mesmo foi destampado e o sangue escoado ao longo de sua parede até a marca estabelecida para o volume

correto, tendo sido imediatamente homogeneizado ao anticoagulante pela inversão repetida e suave do tubo de colheita. Separou-se, distribuiu-se em alíquotas e congelou-se o plasma sanguíneo para análise pela técnica de AGID, de acordo como relatado adiante, nos tópicos 2.6 e 2.7.

Logo em seguida à colheita do sangue, inoculou-se o volume total da suspensão com o VLB purificado, também por venopunção jugular. Para tal, utilizou-se seringa descartável de 10mL e agulha com a mesma dimensão acima referenciada.

Seis semanas após a inoculação viral, procedeu-se novamente a colheita de 4 mL de sangue do animal, segundo a metodologia acima descrita e sucessivamente a cada 30 dias, totalizando 4 colheitas pós-infecção. O material biológico proveniente de todas essas colheitas foi também analisado pela técnica de AGID, tendo como referência um soro positivo remetido pelo laboratório nacional de referência para a LEB da Alemanha, já citado no tópico 2.3, a fim de validar sua utilização como soro específico, contendo anticorpos direcionados ao VLB.

2.6 COLHEITA, PREPARO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CAMPO

2.6.1 Animais Testados

Para a obtenção das amostras de campo utilizadas no presente estudo, selecionou-se um rebanho bovino leiteiro pertencente a uma propriedade localizada na região metropolitana de Curitiba, o qual já havia sido testado anteriormente, no ano 2000, apresentando alguns animais reagentes na prova de AGID para a LEB, inclusive havendo o aparecimento da forma clínica da enfermidade no decurso desse experimento (OLLHOFF et al., 2003).

Colheu-se, em duplicata, cinquenta amostras de sangue total, provenientes de bovinos (Bos taurus) de raças com aptidão leiteira, sendo os mesmos identificados numericamente por meio de brincos afixados nas orelhas, todos do

sexo feminino, com idades variando entre 2 e 75 meses, segundo a tabela a seguir.

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DOS BOVINOS DOADORES DAS AMOSTRAS DE SANGUE UTILIZADAS NO EXPERIMENTO (continua)

Nº DO ANIMAL	NOME	RAÇA	DATA DE NASCIMENTO	DATA DE COLHEITA	IDADE À COLHEITA
08	Cinderela	HPB	08/03/97	17/06/03	6 A 3 M
12	Rebeca	HPB	12/04/97	04/06/03	6 A 1 M
23	Danice	HPB	02/07/97	17/06/03	5 A 11 M
24	Íris	HPB	15/07/97	17/06/03	5 A 11 M
27	Angaiba	HVB	20/07/97	04/06/03	5 A 10 M
33	Sherry	HPB	03/08/97	04/06/03	5 A 10 M
34	Ivã	HPB	14/08/97	13/05/03	5 A 9 M
43	Daiana	HPB	17/09/97	20/05/03	5 A 8 M
45	Uddy	HPB	21/10/97	04/06/03	5 A 7 M
47	Uraqueçaba	HPB	26/10/97	13/05/03	5 A 6 M
51	Lembrada	HPB	06/11/97	04/06/03	5 A 6 M
56	Bertha	HPB	17/12/97	13/05/03	5 A 4 M
57	Sheila	HPB	11/12/97	11/06/03	5 A 6 M
58	Angaiba 2	HVB	20/12/97	25/06/03	5 A 6 M
67	Oceania	PS	07/04/97	11/06/03	6 A 2 M
68	Orgulhosa	PS	19/04/97	13/05/03	6 A
69	Obwalden	PS	20/05/97	11/06/03	6 A
70	Orquídea	PS	31/05/97	11/06/03	6 A
73	Orenda	PS	03/08/97	17/06/03	5 A 10 M
74	Odessa	PS	18/08/97	11/06/03	5 A 9 M
81	Sasha	HPB	19/09/98	25/06/03	4 A 9 M
85	Extra	HPB x PIZ	Indeterminada	25/06/03	Indeterminada
200	Samanta	HPB	18/01/00	25/06/03	3 A 5 M
201	Tieta	HPB	11/02/01	20/05/03	2 A 3 M
300	Lidiane	HPB	21/01/00	02/07/03	3 A 5 M
301	Rena	HPB	01/02/01	30/07/03	2 A 5 M
403	Flora	HPB	22/02/03	07/08/03	5 M
503	Gonda	PS	24/02/03	07/08/03	5 M
603	Bhoemia	HPB	07/03/03	07/08/03	5 M
700	Janne	HPB	15/04/00	02/07/03	3 A 2 M
901	Obwalden 2	PS	26/08/99	30/07/03	3 A 11 M
906	Gabi	HPB	03/10/99	02/07/03	3 A 9 M
907	Orgulhosa 2	PS	08/10/99	20/05/03	3 A 7 M
911	Elaine	HPB	30/10/99	20/05/03	3 A 6 M
917	Brida	HPB	19/12/99	02/07/03	3 A 6 M
918	Priscila	PS	23/12/99	17/06/03	3 A 5 M
921	Natalina	HPB	25/12/99	02/07/03	3 A 6 M
1001	Betina	HPB	24/03/01	20/05/03	2 A 1 M

TABELA 3 - IDENTIFICAÇÃO DOS BOVINOS DOADORES DAS AMOSTRAS DE SANGUE UTILIZADAS NO EXPERIMENTO (conclusão)

1003	Palmyra	HPB	17/03/03	07/08/03	4 M
1103	Joaquina	PS	26/03/03	08/08/03	4 M
1301	Senna	HPB	01/05/01	30/07/03	2 A 2 M
1401	Dominique	HPB	05/05/01	30/07/03	2 A 2 M
1403	Jamaica	HPB	13/04/03	08/08/03	3 M
1503	Verônica	HPB	14/04/03	08/08/03	3 M
1603	Alcionete	HPB x PS	25/04/03	08/08/03	3 M
1701	Suky	HVB	02/06/01	30/07/03	2 A 1 M
1803	Altiva	HPB	01/05/03	08/08/03	3 M
1901	Blanche	HPB	07/07/01	30/07/03	2 A
1903	Tiffany	HPB	13/05/03	08/08/03	2 M
2602	Melodia	PS	29/12/02	07/08/03	7 M

Legenda **HPB - holandês preto e branco** **PIZ - pinzgauer**
 HVB - holandês vermelho e branco **A - anos**
 PS - pardo suíço **M - meses**

Com relação à nutrição na época da colheita das amostras, os exemplares do rebanho estudado recebiam diariamente, no cocho, uma dieta constituída por: ração comercial da marca Agrária de acordo com a faixa etária, silagem de milho elaborada na propriedade, feno de Tifton 85 oriundo de uma propriedade localizada no oeste do Paraná, bagaço de malte (resíduo de cervejaria) proveniente da AmBev (Companhia de Bebidas das Américas), sal mineral, bicarbonato de sódio e gordura protegida da marca Lacto Plus. Além dessa dieta, dependendo da disponibilidade na propriedade, o pasto *in natura* nativo da época (aveia ou azevém no inverno e capim papuã no verão) costuma ser fornecido picado no cocho.

A propriedade em questão emprega um sistema de criação tecnificado, onde os animais são separados de suas mães logo após o parto, mantendo-se esse contato apenas para a limpeza dos recém-natos. Durante 3 ou 4 dias após o parto, o leite das vacas é retirado e fornecido em mamadeira, individualmente, aos seus próprios bezerros, não havendo a utilização de banco de colostro. Por critério de segurança, o colostro de uma única vaca, selecionada por apresentar-se

cl clinicamente saudável, é mantido congelado para utilização em caso de emergência.

Os bezerros são criados até 70 a 80 dias de idade em piquetes individuais, utilizando-se casinhas móveis, sendo alimentados no balde com leite retirado do tanque de armazenamento, quando são então desmamados e transferidos para piquetes coletivos, onde recebem alimentação no cocho. Os piquetes coletivos comportam, geralmente, 5 a 10 animais nascidos na mesma época.

As vacas em produção são mantidas confinadas em abrigo-lactação, sendo diariamente encaminhadas ao solário, onde permanecem durante 60 a 90 minutos, exceto em dias chuvosos ou úmidos. A dieta do dia é oferecida no cocho dividida em três porções. A ordenha é realizada de forma automatizada, duas vezes ao dia, na sala de ordenha, momento em que os animais são identificados através de sensores elétricos presos em um dos membros posteriores, possibilitando, dessa forma, uma avaliação individualizada da produção de leite. A produção média diária por vaca é de 30 litros de leite.

Trinta dias antes do parto, as vacas são transferidas para um piquete próprio para fêmeas em fase final de gestação. O parto ocorre nesse local, sendo quase sempre assistido, exceto quando acontece à noite.

Quanto ao manejo reprodutivo, as vacas são inseminadas artificialmente com sêmen proveniente de touros de outros rebanhos. É mantido um macho autóctone na propriedade, para utilização em monta natural, quando a inseminação artificial fracassa por três tentativas e não se constatam complicações clínicas relacionadas à infertilidade.

Os bezerros machos nascidos na propriedade são descartados e todas as fêmeas são mantidas para a reposição do plantel, de forma que não há entrada de animais novos na propriedade desde que foi instalada, há cerca de cinco anos, quando 60 vacas foram adquiridas para compor o rebanho. Dessas 60 fêmeas, apenas 15 ainda estão no plantel.

Clinicamente, o problema mais freqüente e que acarreta o maior gasto com medicamentos na propriedade é a mastite.

Os animais foram divididos em grupos, conforme a reatividade nas provas diagnósticas, a fim de se avaliar a influência da infecção pelo VLB sobre os parâmetros do hemograma e sobre a dosagem da proteína plasmática total e do fibrinogênio.

2.6.2 Colheita de Sangue Total

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia mamária, utilizando-se agulhas 40X16,0 (16GX1.1/2") e seringas de 10 mL. Quando houve a necessidade de contenção do animal para a colheita de sangue, esta foi realizada de modo a proporcionar o mínimo de estresse.

Após a colheita, tendo a agulha sido retirada da seringa, o sangue foi transferido para tubos "Vacuette" contendo anticoagulante (EDTA em pó), através do escoamento pela parede dos mesmos (sem se utilizar o sistema de vácuo), sendo 4 mL em cada tubo. Sangue e anticoagulante foram homogeneizados pela inversão suave e repetida dos tubos, já devidamente identificados com o número de cada animal.

Os tubos foram mantidos sob refrigeração dentro de caixas de isopor, utilizando-se para tal gelo comum, sendo assim transportados até os laboratórios onde as diferentes análises constantes nesse estudo foram realizadas.

Como a amostra de sangue de cada animal foi colhida em duplicata, uma das alíquotas contendo 4 mL de sangue total foi encaminhada ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário para Animais de Companhia (HVAC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), onde os hemogramas e os exames bioquímicos foram processados, detalhando-se nos tópicos 2.10 e 2.11 a metodologia empregada para tal. A outra alíquota, também com 4 mL de sangue total, seguiu para o IBMP, onde as amostras a serem utilizadas nas técnicas de AGID, ELISA e PCR - TR foram preparadas e conservadas, conforme descrito a seguir.

2.6.3 Preparo e Conservação das Amostras de Campo

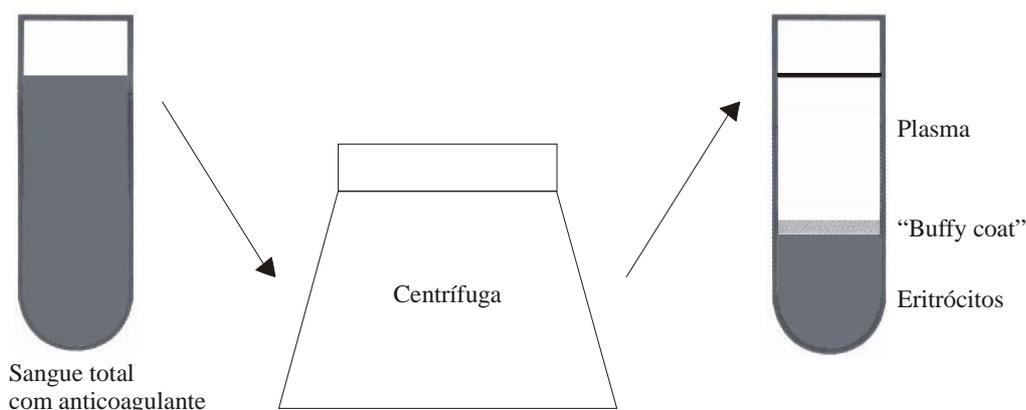
Chegando ao IBMP, as amostras com 4 mL de sangue total bovino foram imediatamente processadas, segundo o exposto abaixo:

1. Retirou-se os tubos da caixa de isopor, mantendo-se os mesmos em estantes, em repouso durante 20 minutos, para as amostras atingirem a temperatura ambiente.
2. Pesou-se os tubos, com a finalidade de equilibrá-los adequadamente na centrífuga.
3. Os tubos foram invertidos suave e repetidamente, com a finalidade de homogeneizar as amostras.
4. Centrifugou-se as amostras a 1.228 X g (3.100 rpm) durante 30 minutos em centrífuga clínica MediSpin[®] IEC.

Após esse período de centrifugação, houve a separação dos elementos sólidos (eritrócitos e “buffy coat”) e da parte líquida do sangue, ou seja, o plasma sanguíneo, conforme mostra a figura 2 adiante.

Para os testes de AGID e ELISA, os quais avaliam a resposta imune do animal pela verificação da presença de anticorpos direcionados ao VLB, utilizou-se o plasma sanguíneo como amostra-teste. No caso da técnica da PCR - TR, foi necessária a extração do DNA dos linfócitos circulantes para a detecção do DNA proviral integrado ao mesmo, quando da presença da infecção viral, sendo que, para tal, as células linfocitárias foram previamente separadas da camada “buffy coat”.

FIGURA 2 - CENTRIFUGAÇÃO DO SANGUE TOTAL PARA A OBTENÇÃO DO PLASMA SANGÜÍNEO E DO “BUFFY COAT”



2.6.3.1 Colheita e conservação do plasma sanguíneo

Findo o processo de centrifugação, colheu-se individualmente da fase superior de cada tubo, o plasma sanguíneo, com o auxílio de uma micropipeta. Esse material biológico foi distribuído em alíquotas de 500 μL , em tubos do tipo Eppendorf previamente identificados com o número de cada amostra.

Conservou-se em “freezer” a 20 °C negativos as amostras de plasma sanguíneo para utilização nos testes de AGID e ELISA.

A metodologia descrita acima, utilizada para a obtenção e conservação do plasma sanguíneo dos bovinos incluídos nesse estudo, foi também empregada para o sangue da ovelha colhido antes e após a infecção viral para análise pela prova de AGID.

2.6.3.2 Obtenção do DNA linfocitário

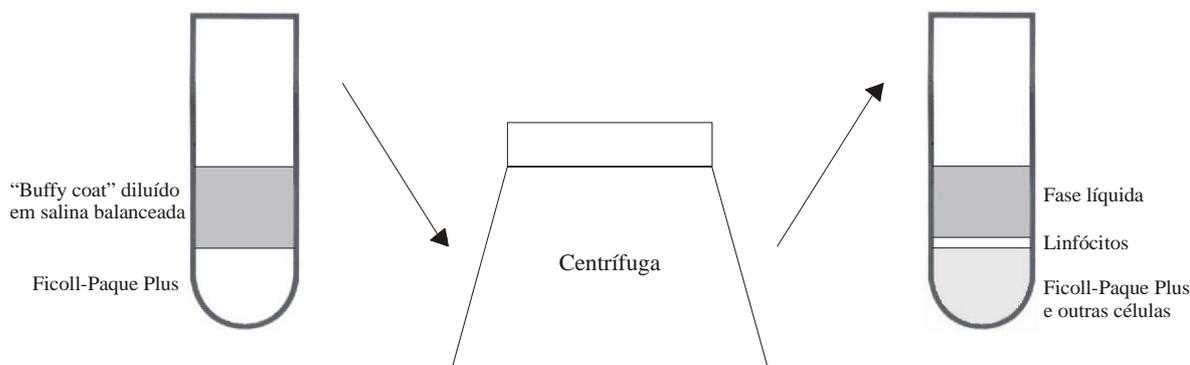
Depois da retirada do plasma sanguíneo de cada tubo, a porção intermediária “buffy coat”, constituída pelos leucócitos e pelas plaquetas, foi colhida utilizando-se uma pipeta plástica descartável do tipo Pasteur.

Individualmente, para cada amostra, diluiu-se e homogeneizou-se a camada contendo os glóbulos brancos em 4 mL de solução salina balanceada, cujo preparo descreveu-se no anexo 6.

Em tubos de centrífuga da marca Falcon, devidamente identificados com o número das amostras, contendo 3 mL de Ficoll-Paque Plus (Amersham, Biosciences), a suspensão de células brancas foi cuidadosamente disposta, de modo a não interferir com o reagente já presente nos tubos. Centrifugou-se a $1.228 \times g$, durante 40 minutos, em temperatura ambiente.

A migração diferencial, durante o processo de centrifugação, resultou na formação de camadas contendo diferentes tipos celulares. Os linfócitos, devido a sua menor densidade, formaram um halo branco entre a fase líquida superior e o Ficoll-Paque Plus, de acordo com o desenho apresentado na figura 3.

FIGURA 3 - SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS LINFOCITÁRIAS POR MEIO DE CENTRIFUGAÇÃO, UTILIZANDO FICOLL-PAQUE PLUS



Para a separação das células linfocitárias, retirou-se, primeiramente, com uma pipeta Pasteur, a fase líquida superior, que foi descartada de acordo como exposto na observação a seguir. Posteriormente, com cuidado, sem interferir no Ficoll-Paque Plus, removeu-se, também com uma pipeta Pasteur, o anel esbranquiçado contendo os linfócitos.

Esse material foi disposto individualmente em tubos Eppendorf identificados, sendo centrifugado em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415 D) a $400 \times g$ durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento

celular foi armazenado em “freezer” a 20 °C negativos, para posterior processamento.

Observação: todo material proveniente do processamento das amostras de sangue foi descartado e mantido em solução de hipoclorito de sódio a 5 % durante, no mínimo, 16 horas antes de sua eliminação na rede sanitária. A preparação da solução de hipoclorito de sódio foi relatada no anexo 7.

Após a separação dos linfócitos, conforme explicado acima, extraiu-se o DNA dessas células, utilizando-se um kit de extração de DNA genômico para células e tecidos da Pharmacia, Biotech (RapidPrep Genomic DNA Isolation Kit for Cells and Tissue), de acordo com as seguintes etapas:

1. Retirada, do “freezer” a 20 °C negativos, dos tubos Eppendorf com o sedimento constituído pelos linfócitos de cada amostra proveniente dos animais analisados nesse experimento.
2. Adição de 50 µL de tampão de extração ao sedimento celular e homogeneização em equipamento denominado “Vortex”, até o desaparecimento dos grumos.
3. Incubação do lisado em banho-maria a 55 °C durante 10 minutos.
4. Adição à amostra de 800 µL de tampão de aplicação e inversão do tubo várias vezes, a fim de se obter uma homogeneização adequada.
5. Incubação da amostra diluída durante 5 minutos em temperatura ambiente.
6. Preparação da coluna, conforme a seqüência a seguir:
 - a) Inverteu-se repetidamente a coluna para suspender completamente a resina no líquido que a contém;
 - b) Removeu-se o lacre inferior e a tampa da coluna, colocando-se a mesma em um tubo do tipo Eppendorf (tubo-suporte);
 - c) Centrifugou-se o conjunto, tubo e coluna, a 735 X g durante 1 minuto;
 - d) Retirou-se o conteúdo do tubo-suporte, recolocando-se o lacre inferior invertido no fundo da coluna para vedá-la.
7. Aplicação da amostra na coluna:
 - a) Colocou-se a metade do volume da amostra diluída (cerca de 400 µL) na coluna preparada previamente, recolocando-se a tampa da mesma;

- b) Para suspender a resina na amostra, inverteu-se a coluna várias vezes;
- c) Manteve-se a coluna em repouso por 1 minuto, para permitir a sedimentação da resina;
- d) Dispôs-se a coluna novamente no tubo-suporte, após remover-se a tampa e o fecho inferior da mesma;
- e) Centrifugou-se a 735 X g durante 2 minutos;
- f) Esvaziou-se o tubo-suporte e vedou-se a coluna com o fecho inferior;
- g) A outra metade da amostra foi aplicada à mesma coluna, repetindo-se o procedimento anterior (letras “a” a “f”).

8. Lavagem da coluna:

- a) Adicionou-se à coluna 400 μL de tampão de lavagem e removeu-se o fecho inferior;
- b) Centrifugou-se a 735 X g durante 2 minutos;
- c) Esvaziou-se o tubo-suporte e vedou-se a coluna com o fecho inferior;
- d) Repetiu-se o procedimento de lavagem.

9. Eluição:

- a) Substituiu-se o tubo-suporte por um tubo Eppendorf limpo;
- b) Adicionou-se 200 μL de tampão de eluição à coluna e removeu-se o fecho inferior;
- c) Centrifugou-se a 735 X g durante 2 minutos e vedou-se a coluna com o fecho inferior;
- d) Com o mesmo tubo-suporte, aplicou-se à coluna mais 200 μL de tampão de eluição e removeu-se o fecho inferior;
- e) Centrifugou-se a 735 X g durante 2 minutos, resultando no tubo-suporte aproximadamente 400 μL de DNA eluído.

10. Precipitação do DNA:

- a) Ao DNA eluído, adicionou-se 320 μL de isopropanol gelado;
- b) Misturou-se vigorosamente o DNA e o isopropanol, invertendo o tubo várias vezes;
- c) Incubou-se em temperatura ambiente por um período de 12 horas;
- d) Centrifugou-se a 16.000 X g durante 10 minutos;

- e) Sendo o sedimento que contém o DNA de difícil visualização, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante com uma micropipeta, descartando-se o mesmo;
- f) Adicionou-se ao DNA 10 μ L de água ultrapura, permitindo um período de hidratação de 1 a 2 horas em temperatura ambiente, sem suspender o sedimento;
- g) Com uma micropipeta, misturou-se suavemente a água ao DNA, até dissolvê-lo por completo. Conservou-se o DNA linfocitário das amostras de campo congelado em “freezer” a 20 °C negativos.

Observação: Os tampões utilizados na extração do DNA dos linfócitos foram fornecidos juntamente com o kit, sendo que o conteúdo de cada um deles foi apresentado no anexo 8, bem como a composição da resina contida na coluna.

2.7 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE AGID

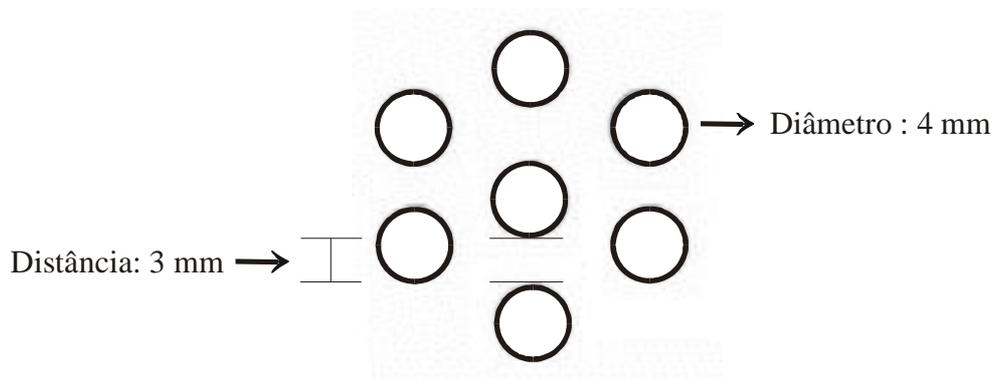
As amostras-teste utilizadas na técnica de AGID foram preparadas e conservadas no IBMP; no entanto, o teste em si e também o preparo das placas com gel de agar foram processados na Divisão de Antígenos do Departamento de Produção do TECPAR, na unidade Juvevê.

Observação: Descreveu-se, no anexo 9, o preparo das placas com gel de agar a 0,9 %, bem como a solução e o tampão utilizados para tal.

As placas com gel de agar a 0,9 %, armazenadas em câmara úmida a 4 °C, foram avaliadas antes de sua utilização, verificando-se suas condições de conservação em relação à presença de desidratação ou umidade excessiva no agar. Estando as mesmas adequadas para uso, permaneceram por 30 minutos, sem as tampas, em temperatura ambiente.

Em seguida, procedeu-se a perfuração dos poços no agar com um cortador padrão de aço inoxidável do tipo “roseta” com 7 furadores de 4 mm de diâmetro distanciados, no máximo, 3 mm entre si, sendo 1 central e 6 periféricos. A figura 4 mostra a disposição dos furadores.

FIGURA 4 - DISPOSIÇÃO DOS FURADORES NO CORTADOR PADRÃO PARA A TÉCNICA DE AGID

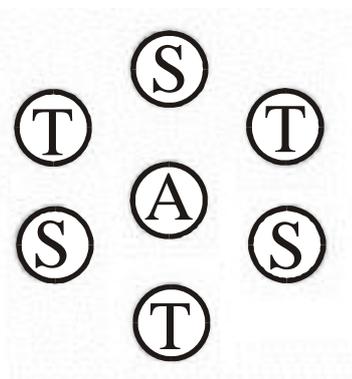


Removeu-se por sucção o cilindro de agar e a umidade residual de cada poço, através de uma ponteira conectada a uma bomba a vácuo. As placas foram imediatamente utilizadas após o corte.

Antes de se adicionar os reagentes, antígeno (tópico 2.3) e soro específico (tópico 2.5), e as amostras-teste, ou seja, o plasma sanguíneo obtido das amostras bovinas de campo (tópico 2.6) aos poços cortados no gel de agar, verificou-se a adesão do mesmo ao fundo da placa. Como controle da prova, os soros alemães de referência para a AGID foram testados em paralelo às amostras-teste.

Utilizando-se uma micropipeta e ponteiras individuais, os soros de referência e as amostras-teste foram dispostos em poços periféricos alternados, possibilitando analisar-se 3 deles no conjunto de 7 poços perfurados em cada placa. Ao restante dos poços periféricos, também de maneira alternada, colocou-se o soro específico contendo anticorpos direcionados ao VLB, proveniente da ovelha infectada. Por último, ao poço central, adicionou-se o antígeno. Com essa disposição, exposta adiante na figura 5, a especificidade de toda reação produzida por uma amostra-teste pôde ser confirmada, verificando-se sua identidade com as linhas de precipitação formadas entre o poço central, onde se colocou o antígeno, e os poços periféricos em que o soro específico foi disposto. É importante salientar que todos os poços foram preenchidos completamente até o nível superior do agar, evitando-se o extravasamento tanto das amostras como dos reagentes.

FIGURA 5 - DISPOSIÇÃO DOS REAGENTES E AMOSTRAS-TESTE NAS PLACAS DE AGID



Legenda T - amostras-teste S - soro específico A - antígeno.

As placas foram incubadas dentro de uma câmara úmida, em temperatura ambiente, por um período de 5 dias.

A leitura do teste foi realizada em ambiente escuro, com o auxílio de um foco de luz forte em feixe estreito, a fim de se verificar a presença de linhas de precipitação entre os poços periféricos e o poço central. As placas foram observadas a cada 24 horas contra um fundo preto, para facilitar a visualização das reações.

As reações originadas entre o antígeno e o soro específico foram a base para a leitura do teste de AGID. Dessa forma, validou-se cada teste pela presença de nítidas linhas de precipitação (linhas-controle) entre os poços contendo esses dois reagentes.

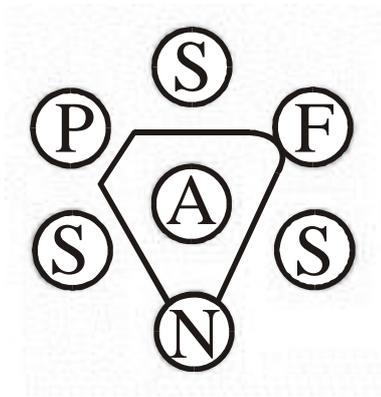
Já para a interpretação da prova, observou-se o tipo de reação em cada amostra-teste, a qual variou conforme a concentração de anticorpos existente na mesma. Os seguintes tipos de reação foram observados nas amostras testadas:

- 1. Negativa** - ocorre quando a amostra não apresenta qualquer concentração de anticorpos e, portanto, não se forma linha de precipitação entre a mesma e o antígeno; as linhas controle se prolongam, sem se curvarem, para dentro do poço contendo a amostra negativa.

- 2. Fracamente positiva** - a amostra apresenta baixo título de anticorpos, não havendo a formação de uma linha de precipitação completa entre a mesma e o antígeno; porém, as linhas-controle se prolongam em direção ao poço com a amostra fracamente positiva e, bem próximo dele, curvam-se ligeiramente.
- 3. Positiva** - a concentração de anticorpos na amostra é alta, sendo que essa reação caracteriza-se pela presença de uma linha de precipitação completa entre a mesma e o antígeno, a qual une-se com as linhas controle, formando uma linha contínua de identidade específica.

A figura 6 apresenta o desenho esquemático dos diferentes tipos de reação que foram observados nas amostras testadas pela AGID.

FIGURA 6 - TIPOS DE REAÇÕES OBSERVADOS NAS AMOSTRAS TESTADAS PELA AGID



Legenda

- P** - amostra positiva
F - amostra fracamente positiva
N - amostra negativa
S - soro específico
A - antígeno.

2.8 DESENVOLVIMENTO DE TESTE ELISA

2.8.1 Preparação do Antígeno

Na elaboração do antígeno para o teste ELISA, utilizou-se como matéria-prima o meio de cultura das células FLK-BLV, conforme relatado no tópico 2.1.

O procedimento de preparação do antígeno para o teste ELISA seguiu rigorosamente as mesmas etapas daquele empregado para a elaboração do antígeno utilizado na prova de AGID. No entanto, a metodologia diferiu no que diz respeito à composição do meio de manutenção (MM) colocado no cultivo celular após a formação das monocamadas. No caso do antígeno para o teste ELISA, o MM empregado foi preparado sem SFB, enquanto que o MM utilizado para a elaboração do antígeno para a prova de AGID apresentou 1 % de SFB em sua composição.

Após a elaboração do antígeno, determinou-se sua concentração protéica pelo método de Bradford (“Bio-Rad Protein Assay”), descrito no anexo 10.

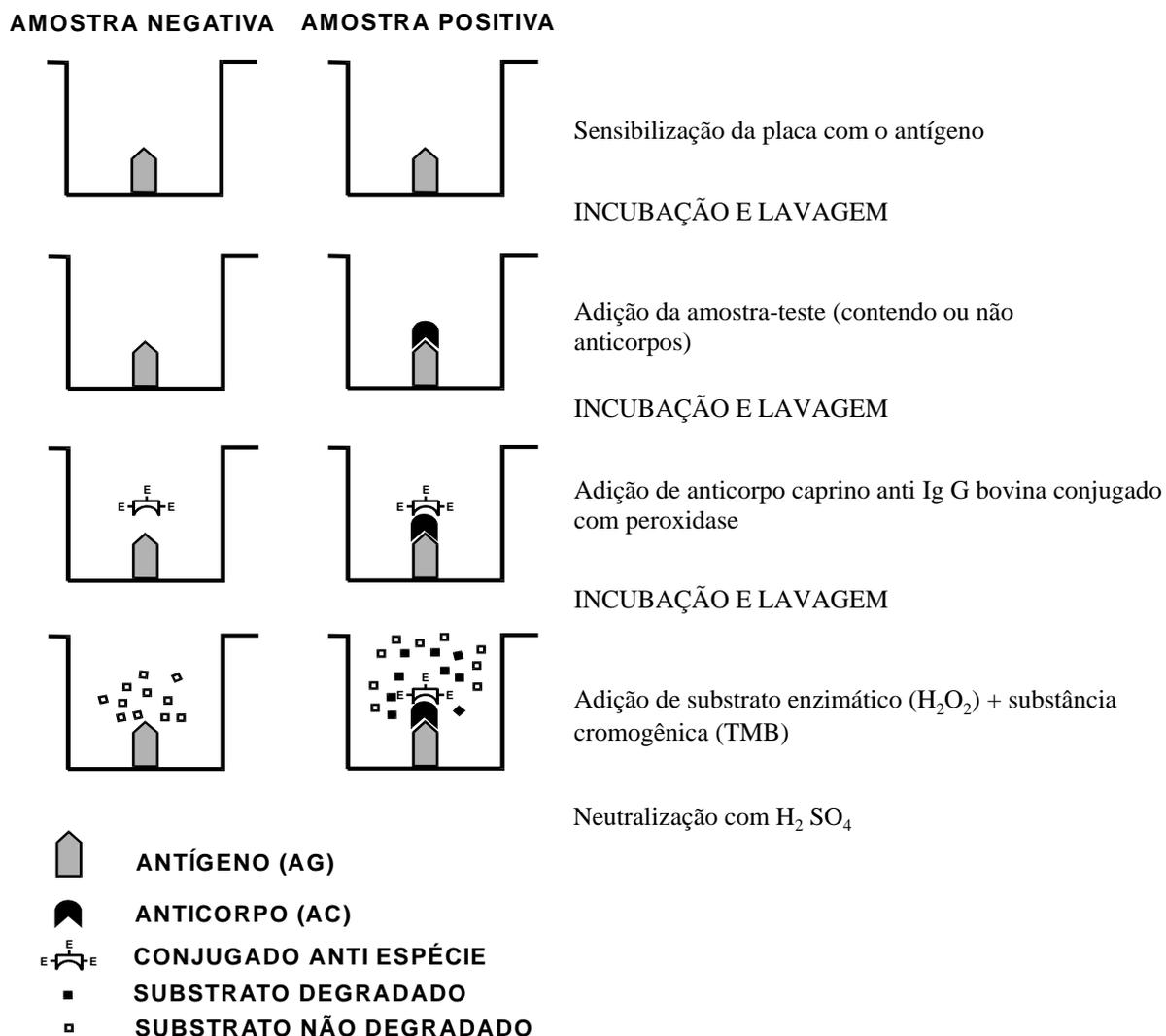
A preparação antigênica obtida foi então distribuída em alíquotas de 200 μ L em tubos Eppendorf devidamente identificados, os quais foram congelados a 20 °C negativos até o momento do uso.

2.8.2 Metodologia Empregada

O teste ELISA desenvolvido neste estudo baseou-se no método indireto para detecção de anticorpos, descrito por VOLLER et al. (1976, p. 55-56), onde a seqüência de etapas foi basicamente a mesma citada por MELÉNDEZ et al. (1987, p. 6-8).

A figura 7 a seguir apresenta, de modo esquemático, o método indireto de VOLLER et al. (1976, p. 56), modificado por MELÉNDEZ et al. (1987, p. 9) e adaptado com os reagentes utilizados neste experimento.

FIGURA 7 - ETAPAS DO TESTE ELISA INDIRETO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS



O teste ELISA difere das provas sorológicas convencionais em virtude de seu sistema indicador (JACOBSON et al., 1982). A amplificação inerente ao sistema enzima/substrato, onde apenas uma molécula de peroxidase pode reagir com até 100.000 moléculas de substrato por minuto gerando um produto colorido, permite medir quantidades ínfimas de antígeno ou anticorpo (MELÉNDEZ et al., 1987). A intensidade da cor desenvolvida é diretamente proporcional à concentração do componente que se quer detectar na amostra-teste, como, por exemplo, os anticorpos específicos para o VLB.

A reação enzima-substrato e a formação do produto colorido ocorrem da seguinte maneira: a peroxidase, presente no sistema, atua sobre o peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), catalisando a liberação de oxigênio atômico ($1/2 O_2$). O cromógeno, no caso o TMB (tetrametilbenzidina), que é incolor em seu estado reduzido, ao reagir com o oxigênio liberado, oxida-se, adquirindo coloração azul.

De acordo com CHANCE (1955), as peroxidases catalisam, por meio dos peróxidos, a oxidação de uma ampla variedade de substâncias, onde os produtos desta oxidação apresentam elevada absorvância, ocorrendo, na reação em questão, duas etapas. A primeira delas é a formação do complexo enzima-substrato. Na segunda etapa, esse complexo interage com a molécula doadora de hidrogênio, que é a substância cromogênica, formando o produto colorido da reação, cuja medida da absorvância é o resultado do teste ELISA.

2.8.3 Titulação dos Reagentes

Com o objetivo de determinar as concentrações ótimas dos reagentes utilizados no teste ELISA, foram analisadas 3 diluições do antígeno (tópico 2.8.1), 3 diluições do conjugado, obtido comercialmente da Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. - KPL e 2 diluições dos soros. Para tal, foram utilizados os soros: 17/99 (positivo), 32/02 (negativo) e 4/99 (fraco positivo), cedidos pelo Dr. Dagmar Beier, por serem soros de referência para o teste em questão.

Na primeira etapa da titulação, foram testadas as diluições 1:100, 1:200 e 1:1.000 do antígeno contra as diluições 1:4.000 e 1:6.000 do conjugado nas diluições 1:100 e 1:200 dos soros negativo e positivo de referência.

A partir dos resultados da primeira etapa da titulação, analisou-se a diluição 1:100 do antígeno contra a diluição 1:10.000 do conjugado na diluição 1:100 dos soros de referência negativo, fraco positivo e positivo.

Todas as condições inerentes ao teste desenvolvido, tais como tampões e soluções utilizados (apresentados no anexo 11), modo de diluição de cada reagente, procedimentos de incubação e lavagem das placas, processamento das leituras e obtenção dos resultados foram igualmente adotados na titulação dos reagentes, tendo sido descritas no tópico 2.8.4.

2.8.4 Teste das Amostras de Campo

Todas as 50 amostras de campo incluídas neste estudo foram testadas em duplicata, obtendo-se 2 valores de absorvância para cada uma delas, sendo o resultado final a média entre esses 2 valores.

Como controle da prova, os soros de referência negativo (32/02) e positivo (17/99) para o teste ELISA foram também testados em duplicata, simultaneamente às amostras de campo.

As etapas do teste ELISA desenvolvido são descritas detalhadamente a seguir:

1. Adsorção do antígeno à fase sólida (tiras individuais Nunc-Immuno™ Modules, de poliestireno, com 16 orifícios, as quais são dispostas em suportes, formando placas com 96 orifícios):

- a) descongelou-se uma alíquota do antígeno preparado para o teste ELISA (tópico 2.8.1), mantendo-se a mesma em banho de gelo;
- b) o antígeno foi diluído em tampão de sensibilização, na diluição apropriada determinada pela titulação dos reagentes, detalhada no tópico 2.8.3;
- c) adicionou-se 100 μL do antígeno diluído a cada orifício das placas;
- d) as placas foram vedadas com adesivos e tampas e incubadas a 37 °C por 1 hora, ou a 4 °C por um período de 12 horas.

2. Lavagem das placas:

- a) adicionou-se 250 μL de PBS a cada orifício das placas, com uma micropipeta multicanal;
- b) manteve-se o PBS nas placas durante 1 minuto;
- c) as placas foram drenadas por inversão;
- d) repetiu-se todo o procedimento, totalizando 3 lavagens;
- e) após a terceira e última lavagem, as placas foram suavemente batidas em posição invertida sobre uma toalha de papel seca, para retirar o PBS excedente. Objetivou-se, com essa etapa de lavagem, eliminar todo o antígeno não aderido à fase sólida.

3. Bloqueio das placas:

- a) com micropipeta multicanal, adicionou-se 200 μL de tampão de bloqueio a cada orifício das placas;
- b) após a vedação com adesivos e tampas, as placas foram incubadas em estufa à temperatura de 37 °C durante 1 hora.

A finalidade do tampão de bloqueio é preencher os sítios ligantes das placas, os quais não foram impregnados com o antígeno, a fim de não permitir ligações nas etapas posteriores.

4. Repetiu-se o procedimento de lavagem das placas, conforme descrito no item 2, para retirar os resquícios da substância bloqueadora presente no tampão de bloqueio.

5. Adição das amostras-teste:

- a) as amostras de plasma sanguíneo bovino, armazenadas em “freezer” a 20°C negativos (tópico 2.6.3.1) foram descongeladas, homogeneizadas e centrifugadas;
- b) procedeu-se a diluição das mesmas em tampão de bloqueio, atingindo a concentração estabelecida pela titulação dos reagentes (tópico 2.8.3);
- c) com o auxílio de uma micropipeta, as amostras diluídas foram adicionadas à placa em duplicata no volume de 100 μL por orifício;
- d) incubou-se as placas a 37 °C por 1 hora, após a vedação das mesmas.

No caso de amostras positivas, os anticorpos presentes reagem especificamente com as moléculas de antígeno ligadas à placa.

6. Para a lavagem das placas e remoção do restante dos componentes plasmáticos, adotou-se o mesmo procedimento descrito no item 2 acima, embora se utilizando tampão de lavagem ao invés de PBS, e repetindo-se o processo até totalizar 5 lavagens e não apenas 3.

7. Adição de imunoglobulina antiespécie (anticorpo caprino anti-IgG bovina) conjugada com a enzima peroxidase:

- a) utilizou-se conjugado da marca KPL, o qual foi reidratado com água ultrapura e distribuído em alíquotas de 10 μL , sendo as mesmas armazenadas a 20 °C negativos;

b) um volume de 100 μL de conjugado, diluído em tampão de bloqueio na concentração apropriada previamente analisada na titulação dos reagentes, foi adicionado a cada orifício das placas;

c) as placas, depois de vedadas, foram incubadas a 37 °C por 1 hora.

8. As placas foram lavadas de acordo com o item 6, com o objetivo de retirar-se todo o conjugado não fixado.

9. Revelação:

a) 100 μL de solução de revelação recém-preparada foram acrescentados a cada orifício das placas com micropipeta multicanal;

b) incubou-se as placas no escuro por um período de 10 minutos (tempo padronizado na titulação dos reagentes).

10. Utilizou-se 50 μL de solução de neutralização por orifício, a fim de se interromper a reação entre a enzima e o substrato.

11. Realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro multicanal da marca Bio-Tek® em comprimento de onda de 450 nanômetros.

Observação: Apresentou-se, no anexo 11, o preparo dos tampões e soluções necessários à execução do referido teste.

12. Os valores das absorbâncias foram impressos na impressora DeskJet 840 C (Hewlett Packard), acoplada ao espectrofotômetro.

2.8.5 Teste dos Soros de Referência

Para auxiliar na determinação de um ponto de corte para o teste ELISA, os soros alemães de referência para a AGID foram analisados de maneira idêntica às amostras de campo.

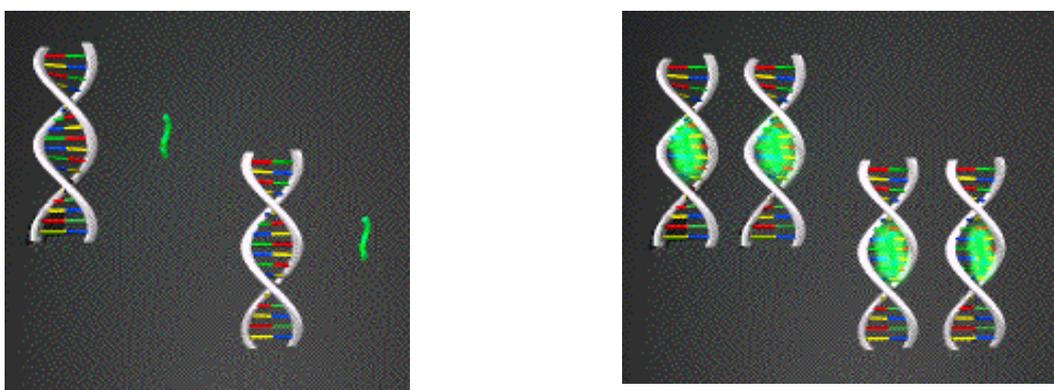
2.9 TÉCNICA DA PCR - TR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEB

Desenvolveu-se a técnica da PCR-TR para a detecção do DNA proviral do VLB nos linfócitos de animais infectados, sendo a mesma utilizada como teste

“gold standard” para validar os resultados das análises em AGID e ELISA, além de possibilitar um diagnóstico rápido da LEB.

O fundamento dessa técnica molecular, como ilustra a figura 8, consiste na detecção da fluorescência emitida pelo SYBR[®] Green, um fluoróforo que se liga a moléculas de DNA com dupla fita originadas, nesse ensaio, pela amplificação específica de fragmentos do gene pol do VLB, através de iniciadores desenhados para tal.

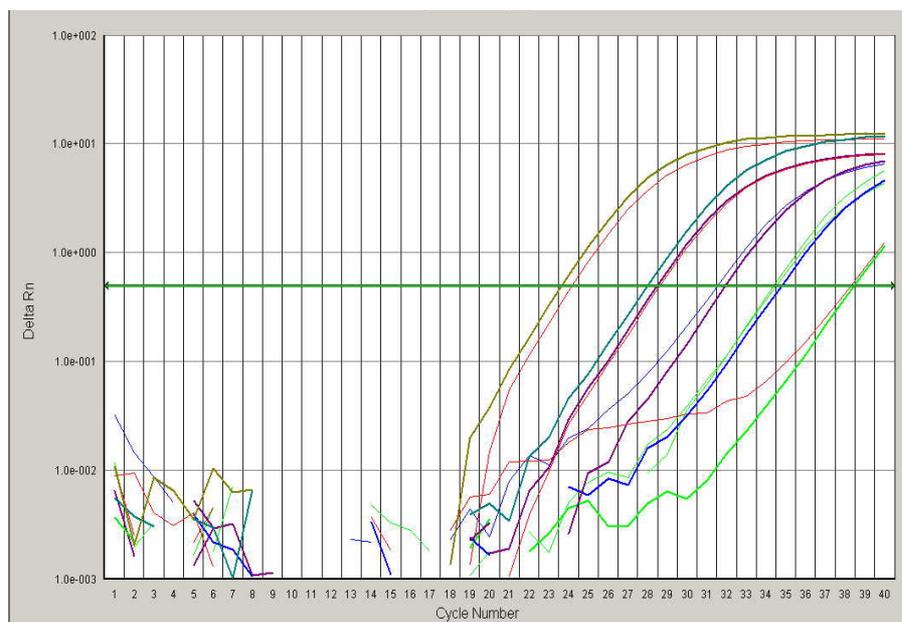
FIGURA 8 - FUNDAMENTO DA PCR-TR, UTILIZANDO O FLUORÓFORO SYBR[®] GREEN



A fluorescência emitida em cada ciclo de amplificação é captada pelo sistema de detecção de sequência ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) e representada em um gráfico, conforme mostra a figura 9. Determina-se, manualmente, o valor de fluorescência que será utilizado para a análise de todas as amostras, estabelecendo-se horizontalmente uma reta (linha limiar ou “threshold”) que corta as amostras quando sua amplificação está na fase exponencial. O ciclo de amplificação em que a fluorescência de certa amostra atinge a linha limiar é denominado de ciclo limiar ou “threshold cycle”.

O gráfico apresentado nesta figura 9 representa a fluorescência emitida pelo SYBR[®] Green versus o ciclo de amplificação. A reta traçada horizontalmente, representada na cor verde, é a linha “threshold” ou limiar.

FIGURA 9 - FLUORESCÊNCIA EMITIDA PELO SYBR[®] GREEN VERSUS CICLO DE AMPLIFICAÇÃO



Visto que esse teste não requer nenhum tipo de processamento após a reação de PCR, pode-se citar como vantagens desse método em relação à PCR convencional a agilidade na obtenção dos resultados e, especialmente, a impossibilidade de contaminação das amostras em teste com o produto de uma amplificação anterior, já que o material amplificado pode ser descartado sem que o tubo seja aberto.

2.9.1 Desenho dos Iniciadores

Através da rede mundial de computadores, obteve-se no banco de genes (“GenBank”) do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), a seqüência genômica de 5 isolados do VLB de diferentes países, conforme as referências a seguir:

1. Código K02120 (SAGATA et al., 1985)
2. Código M10987 (RICE et al., 1985)
3. Código D00647 (COULSTON et al., 1990)
4. Código NC_001414 (PETROPOULOS et al., 1997)
5. Código AF257515 (DUBE et al., 2000)

Utilizando-se o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997), essas 5 seqüências foram alinhadas.

Regiões dos genomas que apresentavam um alto grau de similaridade entre os 5 isolados foram visualmente identificadas e transferidas ao programa Primer Express® (Applied Biosystems).

Os iniciadores complementares a tais regiões foram determinados por esse programa, sendo selecionado o conjunto de oligonucleotídeos que melhor se adequava aos parâmetros por ele recomendados.

Esses iniciadores foram então analisados pelo programa Blast do NCBI para verificação de homologia com outros organismos, especialmente outros retrovírus de origem bovina, o que não ocorreu.

Dessa forma, o produto amplificado na PCR-TR, o amplicon, foi um fragmento de 71 pares de bases do gene pol do VLB, parte integrante do segmento codificador da enzima transcriptase reversa.

Abaixo é citada a seqüência de bases nitrogenadas dos oligonucleotídeos iniciadores e do fragmento amplificado, bem como sua posição genômica e seu tamanho:

Iniciador F (“forward”), posição 4535 a 4553, 19 nucleotídeos:

5’AACCCACCTTCCCATgAC 3’

Iniciador R (“reverse”), posição 4579 a 4605, 27 nucleotídeos:

5’TggTAggAggTTAATCTgATTgTgAgT 3’

Amplicon, posição 4535 a 4605, 71 nucleotídeos:

**5’AACCCACCTTCCCATgACTCaggCCCTTTCTCgAgCCCTCTggACT
CACAATCAgATTAACCTCCTACCA 3’**

Legenda A - adenina C - citosina g - guanina T - timina

2.9.2 Metodologia Empregada

Utilizou-se na PCR-TR, como controle positivo, o DNA genômico das células FLK-BLV, extraído pelo método convencional com fenol-clorofórmio e

precipitado com etanol, conforme descrito no tópico 2.9.3. Como controle negativo, utilizou-se água ultrapura em substituição à amostra com o ácido nucléico.

As amostras de DNA linfocitário foram testadas inicialmente sem qualquer diluição. As que resultaram negativas nessa primeira etapa foram testadas novamente na diluição 1:10 e aquelas ainda negativas na segunda fase foram retestadas na diluição 1:100.

Segundo instruções do fabricante, a técnica da PCR-TR foi padronizada com o kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), solução salina tamponada contendo, além do fluoróforo, a enzima Taq DNA polimerase e dNTPs.

A reação foi efetivada em um volume final de 25 µL, sendo 12,5 µL do SYBR[®] Green PCR Master Mix, 1 µL do iniciador “forward” (5 µM), 1 µL do iniciador “reverse” (5 µM), 8,5 µL de água ultrapura e 2 µL da amostra de DNA (puro ou nas diluições 1:10 e 1:100).

Três estágios foram empregados no ensaio, conforme mostra a tabela seguir, a qual lista os parâmetros térmicos e temporais do mesmo.

TABELA 4 - PARÂMETROS UTILIZADOS NA PCR-TR

Estágio	Número de ciclos	Temperatura	Tempo
1	1	50 °C	2 minutos
2	1	95 °C	10 minutos
3	50	95 °C	15 segundos
		60 °C	1 minuto

2.9.3 Extração do DNA Genômico das Células FLK-BLV

As células FLK-BLV foram cultivadas em garrafa com 75 cm² de superfície, conforme descrito no tópico 2.1.

Após a completa formação da monocamada celular, cerca de 48 horas depois do repique, retirou-se o meio de cultivo, tendo o mesmo sido reservado para outros usos.

Adicionou-se um volume de 10 mL de PBS (anexo I) às células, as quais foram imediatamente descoladas com um raspador de borracha estéril da marca Nunc, próprio para esse trabalho (“Cell Scraper”, 23 cm).

As células suspensas no PBS foram transferidas com o auxílio de uma pipeta estéril para um tubo de centrífuga. A garrafa de cultivo foi lavada com mais 4 mL de PBS, que também foram repassados ao mesmo tubo para o aproveitamento total das células que haviam permanecido na garrafa.

A suspensão foi então centrifugada a $1.228 \times g$ (3.100 rpm) durante 10 minutos em centrífuga clínica, da marca MediSpin[®] IEC.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi mantido no próprio tubo de centrífuga, o qual permaneceu em banho de gelo até seu armazenamento a 70°C negativos.

O procedimento de extração do DNA genômico das células FLK-BLV seguiu as etapas abaixo:

1. Retirada do tubo, contendo o sedimento celular, do “freezer” a 70°C negativos, mantendo-se o mesmo em banho de gelo.
2. Adição imediata de 1 mL de tampão de lise ao sedimento de células ainda congelado.

Observação: os tampões e as soluções utilizados na extração do DNA genômico das células FLK-BLV foram detalhados no anexo 12.

3. Utilização do “Vortex” para suspender as células no tampão de lise.
4. Congelamento da suspensão celular, mantendo-se o tubo em banho de gelo seco com etanol durante 5 minutos.
5. Descongelamento rápido da suspensão de células, imergindo-se o tubo em água em temperatura ambiente.
6. Repetição dos procedimentos de congelamento e descongelamento descritos anteriormente nos itens 4 e 5.

7. Transferência do conteúdo para um tubo Eppendorf.
8. Adição de 100 μ L de solução de proteinase K.
9. Incubação do lisado durante 12 horas em banho-maria a 37 °C.
10. Centrifugação em microcentrífuga Eppendorf (modelo 5415 D) a 15.700 X g (13.000 rpm) por 2 minutos, utilizando-se um contrapeso.
11. Colheita de todo o sobrenadante, após a centrifugação, e divisão igualitária do volume em dois tubos Eppendorf.
12. Adição, nos dois tubos, de igual volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, tomando-se a precaução de pegar a fase inferior dessa solução, pois a fase superior é aquosa.
13. Inversão dos tubos várias vezes, a fim de se obter uma homogeneização adequada.
14. Centrifugação em microcentrífuga Eppendorf a 15.700 X g (13.000 rpm) por 10 minutos.
15. Colheita da fase aquosa superior, onde fica o DNA, em outros dois tubos Eppendorf limpos e mensuração do volume acrescentado em cada um deles.
16. Repetição dos procedimentos descritos nos itens 12 e 13 acima.
17. Centrifugação em microcentrífuga Eppendorf a 15.700 X g (13.000 rpm) por 5 minutos.
18. Colheita da fase aquosa superior e transferência da mesma para 2 tubos Eppendorf com capacidade de 2 mL, medindo-se o volume acrescentado.
19. Adição de 1/10 do volume de solução de acetato de sódio 3M pH 7,0 a cada tubo.
20. Homogeneização com uma micropipeta, calculando-se o volume total.
21. Adição do dobro do volume de etanol absoluto de boa qualidade. A solução fica um pouco turva, apresentando uma estrutura delicada semelhante a um fiapo de algodão.
22. Precipitação do DNA em “freezer” a -70 °C durante um período mínimo de 1 hora.

23. Centrifugação em microcentrífuga Eppendorf a 15.700 X g (13.000 rpm) por 15 minutos.

Observação: nessa etapa de extração do DNA, é importante, como referência, posicionar o encaixe da tampa do tubo Eppendorf sempre para fora em todos os procedimentos subseqüentes de centrifugação, a fim de que o “pellet” com o material genômico, que muitas vezes não é visível a olho nu, situe-se desse lado.

24. Descarte do sobrenadante.

25. Adição de 1 mL de solução de etanol a 70 % para “limpeza” do “pellet”.

26. Centrifugação em microcentrífuga Eppendorf a 15.700 X g (13.000 rpm) por 10 minutos.

27. Descarte de todo sobrenadante.

28. Secagem dos “pellets”, mantendo-se os tubos abertos, em temperatura ambiente ou em estufa a 30 °C.

29. Adição de 50 µL de água ultrapura, aguardando-se 30 minutos para a hidratação do DNA.

30. Suspensão da solução com micropipeta, a qual fica viscosa devido à presença de RNA.

31. Aquecimento em banho-maria a 65 °C durante 10 minutos.

32. Adição de 1 µL de solução de RNase A, livre de DNase.

33. Homogeneização através de rápida centrifugação.

34. Incubação em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos.

35. Mistura do material dos dois tubos.

36. Suspensão do conteúdo total com micropipeta, devendo a solução ficar homogênea.

Observação: a presença de material sólido indica a necessidade de um tempo maior de incubação para que haja melhor solubilização. Se não houver solubilização total, centrifuga-se a 15.700 X g (13.000 rpm) por 5 minutos e utiliza-se o sobrenadante.

37. Conservação da amostra no “freezer” a 20 °C negativos.

2.10 METODOLOGIA DO HEMOGRAMA

A fim de se correlacionar a infecção pelo VLB e as manifestações clínicas relacionadas à LEB, tais como as alterações de parâmetros hematológicos, procedeu-se o hemograma dos animais envolvidos no estudo.

As amostras de campo, contendo 4 mL de sangue total bovino, foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica do HVAC da PUC-PR em um prazo máximo de 12 horas após a colheita, tendo sido mantidas sob refrigeração nesse intervalo de tempo.

O processamento do hemograma, conforme se relata a seguir, foi iniciado imediatamente após a chegada das amostras, as quais foram mantidas em estantes na bancada do laboratório, durante alguns minutos, até atingirem a temperatura ambiente.

2.10.1 Confeção dos Esfregaços Sangüíneos

Os esfregaços sangüíneos de cada amostra de campo foram preparados em duplicata, sendo confeccionados em lâminas de vidro para microscópio, secos ao ar, identificados a lápis na borda mais espessa e corados pela técnica de coloração de Wright, a qual foi descrita no anexo 13.

Através dos esfregaços sangüíneos pôde-se realizar a contagem dos diferentes tipos de leucócitos (contagem diferencial) e também observar alterações celulares.

2.10.2 Avaliação da Série Vermelha

2.10.2.1 Contagem dos eritrócitos

O número de eritrócitos por μL de sangue de cada amostra foi determinado em contagem realizada em câmara de Neubauer, pelo método descrito por JAIN (1986), de acordo como se segue:

1. A amostra de sangue total foi homogeneizada pela inversão do frasco de acondicionamento.
2. Com o auxílio de uma micropipeta automática, diluiu-se 20 μL de sangue em 4,0 mL de solução para a contagem de eritrócitos (anexo 14), tomando-se o cuidado de limpar a parte externa da ponteira com um lenço de papel, obtendo-se assim uma diluição de 1:200.
3. Homogeneizou-se a suspensão celular, também com a micropipeta, e preencheu-se os dois lados da câmara de Neubauer para uma contagem em duplicata.
4. Aguardou-se alguns minutos para a sedimentação dos eritrócitos.
5. Posicionou-se ao microscópio (marca Zeiss) em iluminação reduzida, a câmara de Neubauer, sob a lente objetiva de 10 (aumento de 100 vezes), a fim de se observar a distribuição dos eritrócitos.
6. Estando as células vermelhas uniformemente distribuídas, trocou-se para a lente objetiva de 40 (aumento de 400 vezes).
7. Contou-se todos os eritrócitos presentes em 5 dos 25 quadrados centrais, com o auxílio de um contador manual (da marca Veet Root).
8. Calculou-se o resultado multiplicando-se a somatória dos eritrócitos dos 5 quadrados por 10.000, sendo o valor final o número total de eritrócitos por μL ou mm^3 de sangue.
9. Como os eritrócitos foram contados nos dois lados da câmara de Neubauer, o resultado final de cada amostra foi a média desses valores.

2.10.2.2 Determinação do volume globular

O volume globular (VG) foi mensurado em porcentagem pelo método do microhematócrito, segundo JAIN (1986), como descrito a seguir:

1. Homogeneizou-se o sangue por inversões do frasco.
2. Preencheu-se com sangue, por capilaridade, três quartos ($\frac{3}{4}$) de 2 tubos capilares de vidro, específicos para o método do microhematócrito com 75 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro.

3. Fechou-se ao fogo ou com massa de modelar uma das extremidades dos tubos, limpando-se os mesmos externamente.
4. Centrifugou-se os tubos capilares a 13.000 X g durante 5 minutos em microcentrífuga da marca Fanem, específica para o método do microhematócrito.
5. Após a centrifugação, posicionou-se, separadamente e de forma adequada, cada um dos tubos capilares à frente do cartão para microhematócrito fornecido pelo fabricante da microcentrífuga, realizando-se a leitura do resultado no próprio cartão. O resultado final, expresso em porcentagem (%) de glóbulos vermelhos presentes no sangue, foi a média dos valores verificados na leitura de cada um dos tubos.

Observação: os dois tubos capilares foram utilizados também para estimar a concentração das proteínas plasmáticas e do fibrinogênio, conforme relatado no tópico 2.11.

2.10.2.3 Dosagem da hemoglobina circulante

Determinou-se em g/dL, a concentração da hemoglobina nas amostras de sangue, pelo método colorimétrico a partir da formação de cianometahemoglobina.

Para tal, utilizou-se um kit comercial específico da marca Labtest, contendo um reagente de cor (RC) constituído por cianeto de potássio e um padrão de hemoglobina com concentração conhecida.

O fundamento do método consiste na oxidação do ferro da hemoglobina, presente tanto na amostra como no padrão, pelo cianeto de potássio do RC em pH fracamente alcalino, formando a metahemoglobina, que é convertida em cianometahemoglobina, a qual apresenta coloração avermelhada.

A formação de cianometahemoglobina (e, conseqüentemente, a intensidade da cor na reação) é diretamente proporcional à concentração de hemoglobina presente na amostra, sendo a mesma comparada com a concentração de hemoglobina do padrão, conhecida previamente. Essa comparação se dá pela determinação da densidade ótica de cada reação, amostra

e padrão, feita em espectrofotômetro pela leitura da absorbância em um comprimento de onda de 540 nm, ajustando-se o zero do equipamento apenas com o RC.

Obtendo-se no espectrofotômetro as absorbâncias do padrão e da amostra e conhecendo-se a concentração de hemoglobina (Hb) do padrão, calcula-se a concentração de hemoglobina da amostra pela equação a seguir:

$$\text{Concentração de Hb da amostra} = \frac{\text{absorbância da amostra} \times \text{absorbância do padrão}}{\text{concentração de Hb do padrão}}$$

Especificou-se, a seguir, as etapas da técnica utilizada para a dosagem de hemoglobina nas amostras de sangue dos bovinos:

1. Adicionou-se 5 mL do RC em tubos de ensaio limpos e secos.
2. Cada amostra de sangue foi acrescentada, individualmente, com micropipeta no volume de 20 µL, aos tubos com RC, bem como o padrão de hemoglobina fornecido pelo kit. Um dos tubos foi mantido apenas com o RC, sendo utilizado como “branco”.
3. Homogeneizou-se cada tubo com as diferentes amostras e o tubo com o padrão, incubando-se as misturas em temperatura ambiente por um período mínimo de 5 minutos.
4. Ligou-se o espectrofotômetro (da marca Siel) com antecedência de 15 minutos antes das leituras para estabilização do aparelho, ajustando-se adequadamente o comprimento de onda.
5. Com o tubo “branco”, o espectrofotômetro foi zerado e mediu-se as absorbâncias dos tubos com as amostras e com o padrão.
6. Calculou-se os resultados correspondentes às concentrações das amostras, conforme a equação mencionada anteriormente.

2.10.2.4 Cálculo dos índices hematimétricos

Os índices hematimétricos foram calculados conforme referenciado por JAIN (1986), através das correlações entre os parâmetros analisados no eritrograma, descritos nos tópicos anteriores, quais sejam: o número de eritrócitos em milhões (E), o volume globular (VG) e a concentração de hemoglobina circulante (Hb).

Um dos índices analisados, o volume globular médio (VGM), ou seja, o tamanho dos eritrócitos expresso em fentolitros (fL) ou micrômetros cúbicos (μm^3), foi determinado pela fórmula abaixo:

$$\text{VGM} = \frac{\text{VG} \times 10}{\text{E}}$$

Além do VGM, também foram analisados os índices HGM (hemoglobina globular média) e CHGM (concentração de hemoglobina globular média), que expressam, respectivamente em picogramas e em porcentagem, a quantidade de hemoglobina presente em cada glóbulo vermelho, segundo as fórmulas apresentadas a seguir:

$$\text{HGM} = \frac{\text{Hb} \times 10}{\text{VG}}$$

$$\text{CHGM} = \frac{\text{Hb} \times 100}{\text{E}}$$

2.10.3 Avaliação da Série Branca

2.10.3.1 Contagem total dos leucócitos

Para cada amostra de sangue, o levantamento numérico do total de leucócitos foi realizado em câmara de Neubauer, segundo JAIN (1986), conforme descrito a seguir:

1. Inverteu-se várias vezes o tubo contendo a amostra para homogeneizá-la adequadamente.
2. Adicionou-se, com uma micropipeta, 20 μL de sangue em um tubo contendo 0,4 mL de solução para a contagem de leucócitos (anexo 14), limpando-se previamente a parte externa da ponteira, a fim de se obter uma diluição de 1:20.
3. Também com a micropipeta, homogeneizou-se a suspensão e preencheu-se os dois lados da câmara de Neubauer.
4. Após alguns minutos, estando a câmara posicionada ao microscópio (Zeiss) sob a lente objetiva de 10, foram contados os leucócitos dos 4 quadrantes periféricos da mesma, utilizando-se um contador manual (marca Veet Root).
5. Para o cálculo do número total de leucócitos por μL ou mm^3 de sangue, multiplicou-se por 50 a somatória dos leucócitos contados nos 4 quadrantes.
6. O resultado final foi definido pela média dos valores obtidos nos dois lados da câmara de Neubauer.

2.10.3.2 Contagem diferencial dos leucócitos

A contagem dos diferentes tipos de leucócitos (contagem diferencial ou fórmula leucocitária) foi realizada de acordo com JAIN (1986), classificando-se 100 células brancas nos esfregaços sangüíneos, preparados conforme detalhado no item 2.10.1.

Observou-se em microscópio (Zeiss), a porção final (cauda) dos esfregaços sangüíneos, em objetiva de imersão a óleo (aumento de 100 vezes), estabelecendo-se um padrão de movimento da lâmina, a fim de não se classificar duas vezes a mesma célula.

Os leucócitos foram classificados segundo as características morfológicas e tintoriais proporcionadas pela coloração de Wright, tendo sido diferenciados em neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

O valor percentual de cada tipo leucocitário foi determinado após a classificação de cada um dos 100 leucócitos (fórmula percentual). Para tal,

utilizou-se um contador manual específico para contagem diferencial de leucócitos (da marca Kacil), o qual emite um sinal sonoro quando se atinge a marca de 100 células avaliadas.

Com base na fórmula percentual e na contagem total de leucócitos, calculou-se, individualmente para cada amostra, o valor absoluto de cada tipo leucocitário (fórmula absoluta).

2.11 EXAMES BIOQUÍMICOS

Para se complementar os parâmetros analisados no hemograma, estimou-se, nas amostras de sangue, as concentrações das proteínas plasmáticas e do fibrinogênio.

Esses testes também foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica do HVAC da PUC-PR, durante o processamento dos hemogramas.

Para tal, utilizou-se o refratômetro de Goldberg (da marca Kernco), através da técnica apresentada a seguir:

1. O refratômetro foi zerado com uma gota de água destilada e imediatamente seco para a colocação da amostra a ser testada.
2. Uma gota de plasma sanguíneo, obtido de um dos tubos capilares após a mensuração do VG, conforme descrito no item 2.10.2.2, foi disposta na plataforma do aparelho.
3. A leitura foi feita de forma direta em uma escala para mensuração de proteína plasmática total, existente no refratômetro, considerando-se o valor encontrado na linha limítrofe entre os campos claro e escuro.
4. O outro tubo capilar, após a leitura do VG, foi mantido durante 3 minutos em banho-maria a 56 °C, temperatura em que o fibrinogênio precipita, enquanto as outras proteínas do plasma permanecem em solução.
5. A fim de sedimentar o fibrinogênio precipitado, centrifugou-se novamente o tubo capilar após o aquecimento, nas mesmas condições da centrifugação prévia à determinação do VG, ou seja, a 13.000 X g durante 5 minutos em centrífuga de microhematócrito.

6. O tubo foi quebrado acima da camada esbranquiçada contendo o fibrinogênio precipitado e o fluido transferido para a plataforma do refratômetro.

7. Realizou-se a leitura de maneira idêntica à descrita no item 3.

8. Considerou-se a diferença entre as leituras uma estimativa da concentração do fibrinogênio presente na amostra, sendo o resultado obtido em g/dL.

Os resultados dos parâmetros hematológicos analisados nesse estudo foram comparados a valores referenciados por JAIN (1993, p. 21), considerados normais para a espécie bovina, sendo os mesmos transcritos na tabela 5 a seguir:

**TABELA 5 - VALORES NORMAIS DOS PARÂMETROS
HEMATOLÓGICOS PARA A ESPÉCIE BOVINA**

PARÂMETRO	INTERVALO	MÉDIA
Nº de eritrócitos (milhões por μL)	5,0 - 10,0	7,0
VG (%)	24,0 - 46,0	35,0
Concentração de Hb. (g/dL)	8,0 - 15,0	11,0
VGM (fL)	40,0 - 60,0	52,0
HGM (pg)	11,0 - 17,0	14,0
CHGM (%)	30,0 - 36,0	32,7
Nº de leucócitos (por μL)	4.000 - 12.000	8.000
Neutrófilos bastonetes (%)	0 - 2	0,5
Neutrófilos bastonetes (por μL)	0 - 120	20
Neutrófilos segmentados (%)	15 - 45	28,0
Neutrófilos segmentados (por μL)	600 - 4.000	2.000
Eosinófilos (%)	0 - 20	9,0
Eosinófilos (por μL)	0 - 2.400	700
Basófilos (%)	0 - 2	0,5
Basófilos (por μL)	0 - 200	50
Linfócitos (%)	45 - 75	58,0
Linfócitos (por μL)	2.500 - 7.500	4.500
Monócitos (%)	2 - 7	4,0
Monócitos (por μL)	25 - 840	400
Proteínas plasmáticas (g/dL)	7,0 - 8,5	
Fibrinogênio (g/dL)	0,3 - 0,7	

3 RESULTADOS

3.1 PROVA DE AGID

Parte do rebanho bovino selecionado para esse estudo foi testado pela AGID no ano 2000, utilizando-se um antígeno produzido no TECPAR comparativamente a um outro antígeno, importado do Canadá, apresentando em ambas as preparações antigênicas, animais reagentes (DITTRICH e OLIVEIRA, 2000). Em 2003, 18 vacas examinadas em 2000 ainda faziam parte do plantel, sendo as mesmas incluídas no presente experimento, o que permitiu uma comparação dos resultados, conforme mostra a tabela 6. Todas as amostras não reagentes em 2000, em número de 7, foram reativas em 2003, enquanto que as 11 amostras reagentes mantiveram sua reatividade, embora com algumas diferenças na intensidade das reações.

Também na tabela 6 é possível verificar que das 50 amostras estudadas em 2003, 32 apresentaram anticorpos precipitantes direcionados ao VLB detectados pela prova de AGID, enquanto que as 18 restantes foram negativas quando testadas por essa técnica, ou seja 64% de positividade.

Considerando os resultados obtidos no ano 2000, quando 60 amostras da propriedade foram testadas pela AGID, a percentagem de infecção pelo VLB foi de 63,3 % ao se utilizar o antígeno do TECPAR (DITTRICH e OLIVEIRA, 2000).

TABELA 6 - RESULTADO DA PROVA DE AGID EM 2000 E EM 2003
(continua)

Nº DO ANIMAL	RESULTADO AGID 2000	RESULTADO AGID 2003	Nº DO ANIMAL	RESULTADO AGID 2000	RESULTADO AGID 2003
08	POSITIVO	FRACO POSITIVO	301	não realizado	NEGATIVO
12	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	403	não realizado	NEGATIVO
23	POSITIVO	POSITIVO	503	não realizado	NEGATIVO
24	POSITIVO	POSITIVO	603	não realizado	NEGATIVO
27	POSITIVO	POSITIVO	700	não realizado	NEGATIVO
33	NEGATIVO	POSITIVO	901	não realizado	POSITIVO
34	POSITIVO	POSITIVO	906	não realizado	POSITIVO

TABELA 6 - RESULTADO DA PROVA DE AGID EM 2000 E EM 2003
(conclusão)

43	POSITIVO	FRACO POSITIVO	907	não realizado	POSITIVO
45	POSITIVO	FRACO POSITIVO	911	não realizado	POSITIVO
47	POSITIVO	FRACO POSITIVO	917	não realizado	FRACO POSITIVO
51	POSITIVO	FRACO POSITIVO	918	não realizado	FRACO POSITIVO
56	NEGATIVO	POSITIVO	921	não realizado	FRACO POSITIVO
57	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	1001	não realizado	NEGATIVO
58	Não realizado	POSITIVO	1003	não realizado	NEGATIVO
67	NEGATIVO	POSITIVO	1103	não realizado	NEGATIVO
68	NEGATIVO	POSITIVO	1301	não realizado	NEGATIVO
69	Não realizado	POSITIVO	1401	não realizado	NEGATIVO
70	POSITIVO	POSITIVO	1403	não realizado	NEGATIVO
73	FRACO POSITIVO	FRACO POSITIVO	1503	não realizado	NEGATIVO
74	NEGATIVO	FRACO POSITIVO	1603	não realizado	NEGATIVO
81	Não realizado	FRACO POSITIVO	1701	não realizado	NEGATIVO
85	Não realizado	POSITIVO	1803	não realizado	FRACO POSITIVO
200	Não realizado	FRACO POSITIVO	1901	não realizado	NEGATIVO
201	Não realizado	NEGATIVO	1903	não realizado	NEGATIVO
300	Não realizado	POSITIVO	2602	não realizado	NEGATIVO

A totalidade dos soros alemães de referência para a AGID, testados como controle da prova, apresentou resultados idênticos aos relatados pelo laboratório de origem, sendo 6 negativos, 2 fraco-positivos e 7 positivos.

3.2 TESTE ELISA

3.2.1 Concentração Protéica do Antígeno

A concentração protéica do antígeno para o teste ELISA determinada pelo método de Bradford foi de 0,242 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.2.2 Titulação dos Reagentes

A tabela 7 a seguir apresenta os resultados, em valores de absorvância, da primeira etapa da titulação dos reagentes utilizados no teste ELISA, tendo os mesmos sido ilustrados na figura 10. Nesta figura, a diferença entre os valores de absorvância obtidos para o soro positivo e o negativo foi expressa embaixo de cada conjunto da titulação.

TABELA 7 - RESULTADOS DA PRIMEIRA TITULAÇÃO DOS REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE ELISA

CONJUGADO	1:4000			1:6000		
	Ag 1:1000	Ag 1:200	Ag 1:100	Ag 1:1000	Ag 1:200	Ag 1:100
Negativo 1:100	0,828	0,837	0,719	0,609	0,567	0,542
Positivo 1:100	1,108	1,315	1,326	1,035	1,199	1,291
Negativo 1:200	0,622	0,613	0,576	0,455	0,431	0,442
Positivo 1:200	1,020	1,087	1,317	0,955	1,189	1,226

Legenda: Ag - antígeno

FIGURA 10 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DA PRIMEIRA TITULAÇÃO DOS REAGENTES DO TESTE ELISA (*continua*)

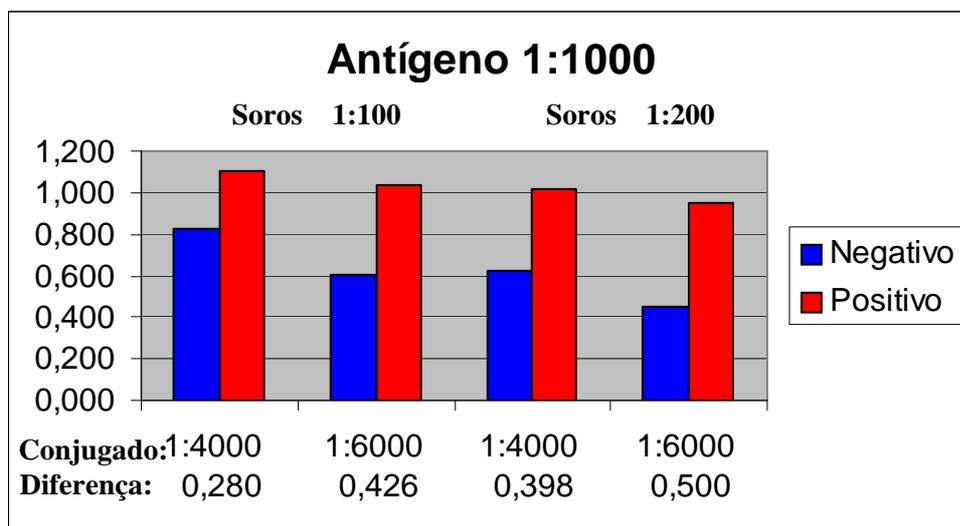
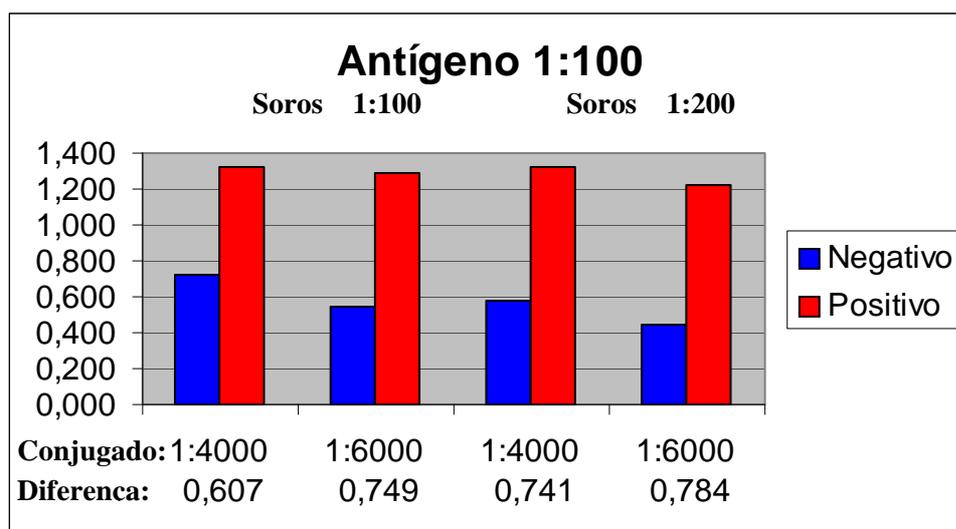
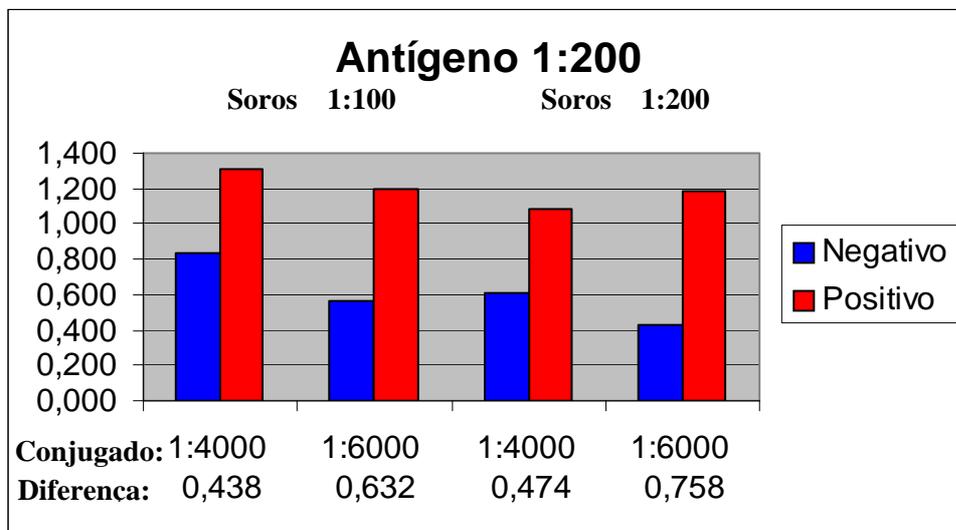


FIGURA 10 - GRÁFICO ILUSTRATIVO DA PRIMEIRA TITULAÇÃO DOS REAGENTES DO TESTE ELISA (conclusão)



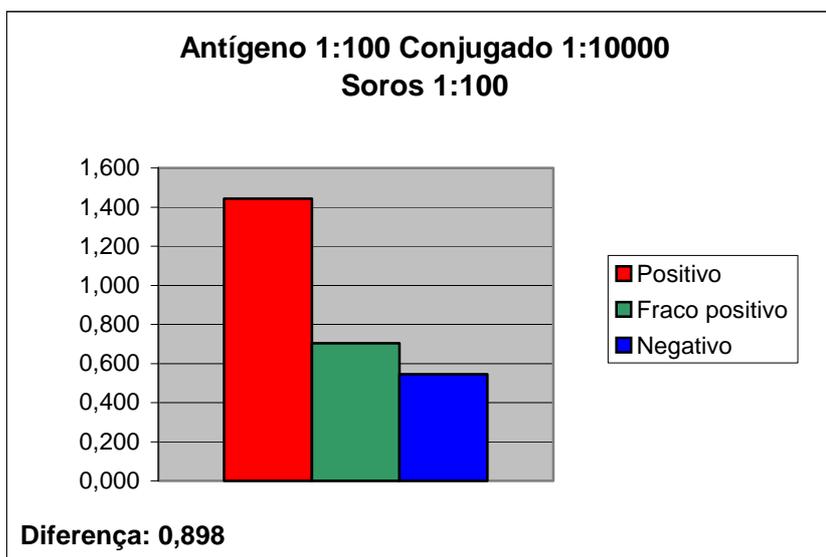
Com base nos resultados anteriores, uma diluição de 1:10.000 do conjugado foi testada com a finalidade de determinar as concentrações ótimas dos reagentes para utilização no teste ELISA. Incluiu-se na análise, além dos soros negativo e positivo anteriormente utilizados, o soro de referência fraco positivo. Os resultados são apontados na tabela 8 e também na figura 11.

TABELA 8 - TITULAÇÃO DEFINITIVA DOS REAGENTES UTILIZADOS NO TESTE ELISA

Ag 1:100 CONJUGADO 1:10.000 Soros de referência 1:100		
Negativo	Fraco positivo	Positivo
0,546	0,704	1,444

Legenda: Ag - antígeno

FIGURA 11 - ILUSTRAÇÃO DOS RESULTADOS DA TITULAÇÃO DEFINITIVA DOS REAGENTES DO TESTE ELISA



Depois de testadas as várias diluições dos reagentes entre si, conforme apresentado acima, optou-se por selecionar para a análise das amostras de campo no teste ELISA, a mesma combinação das concentrações utilizada na titulação cujos resultados foram ilustrados na figura 11, em função dos valores de absorvância obtidos, bem como da diferença de 0,898 entre o sororo positivo e o negativo.

3.2.3 Resultado das Amostras de Campo

A tabela 9 exibe os resultados das 50 amostras de campo no teste ELISA e dos controles utilizados para a prova, que foram os soros de referência negativo (32/02) e positivo (17/99).

TABELA 9 - RESULTADOS DO TESTE ELISA

Nº DO ANIMAL	ABS. 1	ABS. 2	MÉDIA ABS.	Nº DO ANIMAL	ABS. 1	ABS. 2	MÉDIA ABS.
08	0,675	0,631	0,653	403	0,438	0,468	0,453
12	0,860	0,919	0,890	503	0,454	0,456	0,455
23	0,837	0,737	0,787	603	0,567	0,541	0,554
24	1,286	1,273	1,280	700	0,522	0,538	0,530
27	0,964	0,988	0,976	901	1,469	1,556	1,512
33	1,359	1,291	1,325	906	1,324	1,428	1,376
34	0,996	0,967	0,982	907	1,015	1,006	1,010
43	0,749	0,709	0,729	911	0,924	0,965	0,944
45	1,071	1,090	1,080	917	0,846	0,865	0,856
47	1,330	1,339	1,334	918	0,510	0,533	0,522
51	0,943	0,865	0,904	921	0,746	0,724	0,735
56	0,752	0,776	0,764	1001	0,645	0,621	0,633
57	0,640	0,625	0,632	1003	0,429	0,439	0,434
58	0,737	0,765	0,751	1103	0,424	0,418	0,421
67	0,673	0,637	0,655	1301	0,493	0,541	0,517
68	1,202	1,335	1,268	1401	0,485	0,481	0,483
69	0,732	0,688	0,710	1403	0,447	0,512	0,480
70	0,739	0,790	0,764	1503	0,455	0,447	0,451
73	0,824	0,895	0,860	1603	0,444	0,416	0,430
74	0,906	0,922	0,914	1701	0,685	0,690	0,688
81	1,191	1,222	1,206	1803	0,837	0,798	0,818
85	0,691	0,634	0,662	1901	0,514	0,616	0,565
200	0,813	0,834	0,824	1903	0,406	0,405	0,406
201	0,618	0,567	0,593	2602	0,381	0,393	0,387
300	0,639	0,745	0,692	32/02	0,446	0,447	0,446
301	0,555	0,555	0,555	17/99	1,018	1,037	1,028

Legenda: **ABS. 1** - valor 1 de absorbância **ABS. 2** - valor 2 de absorbância
MÉDIA ABS. - média dos valores de absorbância (resultado final)

3.2.4 Resultado dos Soros de Referência

Além dos soros de referência específicos para o teste ELISA, cujos resultados foram relatados acima na tabela 9, os soros de referência para a AGID foram analisados de maneira idêntica às amostras de campo por aquele teste para auxiliar no estabelecimento de um intervalo de valores de absorvância com resultado indeterminado (“gray zone”). Os seguintes valores de absorvância foram encontrados:

- a) soros negativos na AGID: 0,436, 0,431, 0,406, 0,412 e 0,426;
- b) soros fraco-positivos na AGID: 0,580 e 0,526;
- c) soros positivos na AGID: 1,103, 0,886, 1,102, 1,224, 1,182 e 0,534.

As médias desses grupos foram respectivamente: 0,4222, 0,5530 e 1,0052, sendo de 0,5830 a diferença entre o grupo negativo e o positivo. Ao se incluir os resultados dos 2 soros de referência negativo (32/02) e positivo (17/99), específicos para o teste ELISA, quais sejam, 0,446 e 1,028, as médias passam a ser: 0,4262, 0,5530 e 1,0084 com uma diferença entre o grupo negativo e o positivo de 0,5822.

3.3 TÉCNICA DA PCR EM TEMPO REAL

A tabela 10 indica 82% de positividade nas amostras de campo quando testadas pela técnica de PCR-TR, ou seja, das 50 amostras examinadas, houve a amplificação de parte do DNA proviral em 41 delas.

TABELA 10 - REATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE CAMPO NA PCR-TR
(continua)

Nº DO ANIMAL	IDADE À COLHEITA	RESULTADO PCR - TR	Nº DO ANIMAL	IDADE À COLHEITA	RESULTADO PCR - TR
08	6 anos e 3 meses	POSITIVO	301	2 anos e 5 meses	POSITIVO
12	6 anos e 1 mês	POSITIVO	403	5 meses	NEGATIVO
23	5 anos e 11 meses	POSITIVO	503	5 meses	POSITIVO
24	5 anos e 11 meses	POSITIVO	603	5 meses	POSITIVO

TABELA 10 - REATIVIDADE DAS AMOSTRAS DE CAMPO NA PCR-TR
(conclusão)

27	5 anos e 10 meses	POSITIVO	700	3 anos e 2 meses	NEGATIVO
33	5 anos e 10 meses	NEGATIVO	901	3 anos e 11 meses	POSITIVO
34	5 anos e 9 meses	POSITIVO	906	3 anos e 9 meses	POSITIVO
43	5 anos e 8 meses	POSITIVO	907	3 anos e 7 meses	NEGATIVO
45	5 anos e 7 meses	POSITIVO	911	3 anos e 6 meses	POSITIVO
47	5 anos e 6 meses	POSITIVO	917	3 anos e 6 meses	POSITIVO
51	5 anos e 6 meses	POSITIVO	918	3 anos e 5 meses	POSITIVO
56	5 anos e 4 meses	POSITIVO	921	3 anos e 6 meses	POSITIVO
57	5 anos e 6 meses	POSITIVO	1001	2 anos e 1 mês	NEGATIVO
58	5 anos e 6 meses	NEGATIVO	1003	4 meses	POSITIVO
67	6 anos e 2 meses	POSITIVO	1103	4 meses	POSITIVO
68	6 anos	POSITIVO	1301	2 anos e 2 meses	POSITIVO
69	6 anos	POSITIVO	1401	2 anos e 2 meses	POSITIVO
70	6 anos	POSITIVO	1403	3 meses	POSITIVO
73	5 anos e 10 meses	NEGATIVO	1503	3 meses	POSITIVO
74	5 anos e 9 meses	POSITIVO	1603	3 meses	POSITIVO
81	4 anos e 9 meses	POSITIVO	1701	2 anos e 1 mês	POSITIVO
85	Indeterminada	POSITIVO	1803	3 meses	POSITIVO
200	3 anos e 5 meses	POSITIVO	1901	2 anos	POSITIVO
201	2 anos e 3 meses	POSITIVO	1903	2 meses	NEGATIVO
300	3 anos e 5 meses	POSITIVO	2602	7 meses	NEGATIVO

3.4 RESULTADO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE AGID E DA PCR - TR

Houve uma concordância de 66% entre as técnicas de AGID e PCR-TR, uma vez que do total das 50 amostras de campo estudadas, 33 apresentaram resultados iguais nessas provas, sendo 05 negativas e 28 positivas. Das 17 amostras com resultados divergentes (34%), 13 foram positivas na PCR-TR e negativas na AGID, enquanto 4 apresentaram-se negativas na PCR-TR e positivas na AGID (tabela 11).

TABELA 11 - INTERAÇÃO AGID E PCR-TR

RESULTADOS	AGID positivo	AGID negativo	Total
PCR-TR positivo	28	13	41
PCR-TR negativo	04	05	09
Total	32	18	50

Ao se observar a tabela 11, pode-se concluir que 45 amostras foram reagentes em pelo menos uma das provas em questão e somente 5 apresentaram-se negativas em ambas.

3.5 RESULTADO DO TESTE ELISA, EM VALORES DE ABSORBÂNCIA, CONSIDERANDO A REATIVIDADE DAS AMOSTRAS NAS PROVAS DE AGID E DA PCR - TR

A tabela 12 a seguir mostra os valores de absorvância no teste ELISA obtidos pelas 5 amostras negativas tanto na AGID como na PCR-TR, sendo o maior deles de 0,633.

TABELA 12 - VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA OBTIDOS PELAS AMOSTRAS NÃO REAGENTES NAS TÉCNICAS DE AGID E PCR-TR

Nº DO ANIMAL	AGID	ELISA	PCR - TR
403	NEGATIVO	0,453	NEGATIVO
700	NEGATIVO	0,530	NEGATIVO
1001	NEGATIVO	0,633	NEGATIVO
1903	NEGATIVO	0,406	NEGATIVO
2602	NEGATIVO	0,387	NEGATIVO

No entanto, para as amostras reagentes em ambas as técnicas, o menor valor de absorvância obtido no teste ELISA foi de 0,522 (amostra número 918).

O maior valor de absorvância das amostras não reagentes na AGID e na PCR-TR (0,633) em contraposição com o menor valor de absorvância obtido entre as amostras reagentes nestas provas (0,522) também são importantes na interpretação do teste ELISA em relação ao estabelecimento de um intervalo de valores de absorvância com resultado indeterminado (“gray zone”).

3.6 DETERMINAÇÃO DA “GRAY ZONE” PARA O TESTE ELISA DESENVOLVIDO

Tendo-se como base a reatividade conjunta nas provas de AGID e da PCR-TR, as amostras que ficaram no intervalo de valores de absorbância entre 0,522 a 0,633 no teste ELISA, conforme aponta a tabela 13, foram interpretadas como duvidosas ou suspeitas, ou seja, apresentaram resultado indeterminado neste teste.

TABELA 13 - VALORES DE ABSORBÂNCIA INTERPRETADOS COMO RESULTADOS INDETERMINADOS (“GRAY ZONE”) NO TESTE ELISA

Nº DO ANIMAL	RESULTADO AGID	RESULTADO PCR – TR	RESULTADO ELISA
918	FRACO POSITIVO	POSITIVO	0,522
700	NEGATIVO	NEGATIVO	0,530
603	NEGATIVO	POSITIVO	0,554
301	NEGATIVO	POSITIVO	0,555
1901	NEGATIVO	POSITIVO	0,565
201	NEGATIVO	POSITIVO	0,593
57	FRACO POSITIVO	POSITIVO	0,632
1001	NEGATIVO	NEGATIVO	0,633

Considerando os valores médios de absorbância dos grupos negativo, fraco positivo e positivo obtidos pela análise no teste ELISA dos soros de referência para a AGID (0,4262, 0,5530 e 1,0084 respectivamente) e o intervalo de valores de absorbância incluídos na “gray zone” desse mesmo teste, o qual foi estabelecido pelo exame das 50 amostras de campo, delimitou-se como resultado negativo, as amostras com valores de absorbância abaixo de 0,500 e como resultado positivo, as amostras com valores de absorbância acima de 0,650. Os valores incluídos dentro do intervalo de 0,500 e 0,650 foram definidos como resultado indeterminado.

3.7 INTERAÇÕES ENTRE AS TÉCNICAS DE AGID, ELISA E PCR-TR

Após a definição da “gray zone” do teste ELISA, foi possível relacionar os resultados das 3 técnicas desenvolvidas neste estudo para cada uma das amostras de campo, como apresentado na tabela 14.

TABELA 14 - RESULTADO GERAL DAS AMOSTRAS DE CAMPO
(continua)

Nº DO ANIMAL	RESULTADOS AGID	VALORES DE ABS. ELISA	RESULTADOS ELISA	RESULTADOS PCR - TR
08	FRACO POSITIVO	0,653	POSITIVO	POSITIVO
12	FRACO POSITIVO	0,890	POSITIVO	POSITIVO
23	POSITIVO	0,787	POSITIVO	POSITIVO
24	POSITIVO	1,280	POSITIVO	POSITIVO
27	POSITIVO	0,976	POSITIVO	POSITIVO
33	POSITIVO	1,325	POSITIVO	NEGATIVO
34	POSITIVO	0,982	POSITIVO	POSITIVO
43	FRACO POSITIVO	0,729	POSITIVO	POSITIVO
45	FRACO POSITIVO	1,080	POSITIVO	POSITIVO
47	FRACO POSITIVO	1,334	POSITIVO	POSITIVO
51	FRACO POSITIVO	0,904	POSITIVO	POSITIVO
56	POSITIVO	0,764	POSITIVO	POSITIVO
57	FRACO POSITIVO	0,632	INDETERMINADO	POSITIVO
58	POSITIVO	0,751	POSITIVO	NEGATIVO
67	POSITIVO	0,655	POSITIVO	POSITIVO
68	POSITIVO	1,268	POSITIVO	POSITIVO
69	POSITIVO	0,710	POSITIVO	POSITIVO
70	POSITIVO	0,764	POSITIVO	POSITIVO
73	FRACO POSITIVO	0,860	POSITIVO	NEGATIVO
74	FRACO POSITIVO	0,914	POSITIVO	POSITIVO
81	FRACO POSITIVO	1,206	POSITIVO	POSITIVO
85	POSITIVO	0,662	POSITIVO	POSITIVO
200	FRACO POSITIVO	0,824	POSITIVO	POSITIVO
201	NEGATIVO	0,593	INDETERMINADO	POSITIVO
300	POSITIVO	0,692	POSITIVO	POSITIVO
301	NEGATIVO	0,555	INDETERMINADO	POSITIVO

TABELA 14 - RESULTADO GERAL DAS AMOSTRAS DE CAMPO
(conclusão)

403	NEGATIVO	0,453	NEGATIVO	NEGATIVO
503	NEGATIVO	0,455	NEGATIVO	POSITIVO
603	NEGATIVO	0,554	INDETERMINADO	POSITIVO
700	NEGATIVO	0,530	INDETERMINADO	NEGATIVO
901	POSITIVO	1,512	POSITIVO	POSITIVO
906	POSITIVO	1,376	POSITIVO	POSITIVO
907	POSITIVO	1,010	POSITIVO	NEGATIVO
911	POSITIVO	0,944	POSITIVO	POSITIVO
917	FRACO POSITIVO	0,856	POSITIVO	POSITIVO
918	FRACO POSITIVO	0,522	INDETERMINADO	POSITIVO
921	FRACO POSITIVO	0,735	POSITIVO	POSITIVO
1001	NEGATIVO	0,633	INDETERMINADO	NEGATIVO
1003	NEGATIVO	0,434	NEGATIVO	POSITIVO
1103	NEGATIVO	0,421	NEGATIVO	POSITIVO
1301	NEGATIVO	0,517	INDETERMINADO	POSITIVO
1401	NEGATIVO	0,483	NEGATIVO	POSITIVO
1403	NEGATIVO	0,480	NEGATIVO	POSITIVO
1503	NEGATIVO	0,451	NEGATIVO	POSITIVO
1603	NEGATIVO	0,430	NEGATIVO	POSITIVO
1701	NEGATIVO	0,688	POSITIVO	POSITIVO
1803	FRACO POSITIVO	0,818	POSITIVO	POSITIVO
1901	NEGATIVO	0,565	INDETERMINADO	POSITIVO
1903	NEGATIVO	0,406	NEGATIVO	NEGATIVO
2602	NEGATIVO	0,387	NEGATIVO	NEGATIVO

Com base nos dados acima apresentados, considerou-se que o teste ELISA desenvolvido foi capaz de determinar o resultado em 82 % das amostras testadas. Não foi possível interpretar o valor de absorbância obtido em 9 amostras (18 % do total).

3.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EXAMINADOS

3.8.1 Dados da Série Vermelha

A tabela 15 exhibe os resultados obtidos para os parâmetros hematológicos relacionados aos eritrócitos em cada amostra de campo analisada.

TABELA 15 - RESULTADOS DO ERITROGRAMA

Nº DO ANIMAL	Nº DE ERITRÓCITOS (milhões/mm³)	Hb. (g/dL.)	VG (%)	VGM (fL.)	HGM (pg.)	CHGM (%)
08	7,28	11,13	30	41,21	15,29	37,10
12	5,92	12,31	30	50,68	20,79	41,03
23	7,21	10,98	28	38,83	15,23	39,21
24	5,79	10,34	26	44,90	17,86	39,77
27	5,62	10,30	27	48,04	18,33	38,15
33	5,28	11,02	28	53,03	20,87	39,36
34	5,00	9,92	27	54,00	19,84	36,74
43	5,82	11,32	29	49,83	19,45	39,03
45	6,10	12,38	30	49,18	20,30	41,27
47	4,86	11,01	27	55,56	22,65	40,78
51	4,66	10,93	29	62,23	23,45	37,69
56	5,87	12,46	32	54,51	21,23	38,94
57	5,65	12,89	34	60,18	22,81	37,91
58	5,93	11,61	30	50,59	19,58	38,70
67	5,79	12,29	31	53,54	21,23	39,64
68	6,19	12,99	33	53,31	20,98	39,36
69	5,67	11,61	31	54,67	20,48	37,45
70	6,26	13,04	33	52,72	20,83	39,52
73	6,70	10,45	26	38,81	15,60	40,19
74	5,25	10,66	27	51,43	20,30	39,48
81	6,05	12,91	32	52,89	21,34	40,34
85	5,96	12,47	33	55,37	20,92	37,79
200	6,32	11,50	31	49,05	18,20	37,10
201	5,26	9,89	26	49,43	18,80	38,04
300	6,72	12,59	31	46,13	18,74	40,61
301	6,61	10,66	32	48,41	16,13	33,31
403	7,80	11,00	33	42,31	14,10	33,33
503	7,30	11,33	34	46,58	15,52	33,32
603	7,78	12,33	37	47,56	15,85	33,32
700	6,36	13,37	35	55,03	21,02	38,20
901	5,80	9,66	29	50,00	16,66	33,31
906	6,10	12,15	31	50,82	19,92	39,19
907	5,80	9,68	24	41,38	16,69	40,33
911	6,01	12,12	30	49,92	20,17	40,40
917	6,47	12,77	33	51,00	19,74	38,70
918	6,12	11,23	28	45,75	18,35	40,11
921	5,72	10,70	27	47,20	18,71	39,63
1001	5,89	11,00	27	45,84	18,68	40,74
1003	8,10	10,66	32	39,51	13,16	33,31
1103	10,46	11,66	35	33,46	11,15	33,31
1301	5,41	10,33	31	57,30	19,09	33,32
1401	5,60	11,00	33	58,93	19,64	33,33
1403	10,00	11,66	35	35,00	11,66	33,31
1503	8,75	11,33	34	38,86	12,95	33,32
1603	10,42	11,66	35	33,59	11,19	33,31
1701	5,55	10,33	31	55,86	18,61	33,32
1803	9,80	12,33	37	37,76	12,58	33,32
1901	6,70	10,66	32	47,76	15,91	33,31
1903	10,00	11,00	33	33,00	11,00	33,33
2602	7,20	11,66	35	48,61	16,19	33,31

3.8.2 Dados da Série Branca

3.8.2.1 Número total e fórmula percentual de leucócitos

Os resultados inerentes ao leucograma obtidos para cada amostra de campo testada são apresentados nas tabelas 16 e 17 dos tópicos 3.8.2.1 e 3.8.2.2 respectivamente.

TABELA 16 - RESULTADOS DA CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS E DA CONTAGEM RELATIVA DE CADA TIPO LEUCOCITÁRIO (continua)

Nº DO ANIMAL	Nº DE LEUCÓCITOS (por m m ³)	NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS(%)	NEUTRÓFILOS BASTONETES(%)	EOSINÓFILOS (%)	LINFÓCITOS (%)	MONÓCITOS (%)
08	9800	48	2	3	46	1
12	8000	42	7	7	41	3
23	8100	46	0	3	51	0
24	34800	6	0	4	90	0
27	6300	38	3	7	50	2
33	5400	28	0	9	60	3
34	7300	16	1	24	59	0
43	40250	11	3	1	85	0
45	7100	32	5	3	58	2
47	8300	31	0	1	63	5
51	7050	15	6	0	79	0
56	4900	46	1	1	49	3
57	6250	38	0	6	53	3
58	6950	34	0	6	59	1
67	5570	30	2	2	59	7
68	5250	20	1	1	77	1
69	6550	33	2	7	58	0
70	6600	20	3	5	68	4
73	5150	33	4	3	56	4
74	5000	42	0	1	56	1
81	9900	29	2	8	60	1
85	11050	22	1	4	73	0
200	17350	30	0	5	65	0
201	6300	46	3	1	42	8
300	8050	32	3	9	53	3
301	9100	36	0	9	54	1
403	7900	13	5	11	71	0
503	6400	21	4	1	74	0
603	8600	13	0	1	84	2
700	11050	53	0	1	42	4
901	10850	22	1	1	76	0
906	10300	15	1	6	76	2
907	7950	34	1	1	64	0
911	16250	64	0	1	32	3
917	9450	21	2	2	75	0
918	10000	49	0	2	48	1
921	7200	39	0	8	48	5

TABELA 16 - RESULTADOS DA CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS E DA CONTAGEM RELATIVA DE CADA TIPO LEUCOCITÁRIO (**conclusão**)

1001	8000	45	0	2	53	0
1003	6550	12	3	1	79	5
1103	9750	44	9	1	46	0
1301	8600	38	1	3	58	0
1401	9700	32	0	5	60	3
1403	8600	60	1	0	38	1
1503	12650	49	9	1	40	1
1603	14750	41	11	1	45	2
1701	9450	34	0	4	62	0
1803	2400	39	1	0	55	5
1901	7800	27	1	3	66	3
1903	2750	44	1	5	46	4
2602	7650	30	6	0	64	0

Observação: as amostras, em sua totalidade, não apresentaram basófilos na contagem diferencial relativa, por isso essas células não foram incluídas na tabela anterior.

3.8.2.2 Contagem diferencial leucocitária absoluta

TABELA 17 - RESULTADOS DA CONTAGEM ABSOLUTA DOS TIPOS LEUCOCITÁRIOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE CAMPO (**continua**)

Nº DO ANIMAL	NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS (por mm ³)	NEUTRÓFILOS BASTONETES (por mm ³)	EOSINÓFILOS (por mm ³)	LINFÓCITOS (por mm ³)	MONÓCITOS (por mm ³)
08	4704	196	294	4508	98
12	3360	560	560	3280	240
23	3726	0	243	4131	0
24	2088	0	1392	31320	0
27	2394	189	441	3150	126
33	1512	0	486	3240	162
34	1168	73	1752	4307	0
43	4427,5	1207,5	402,5	34212,5	0
45	2272	355	213	4118	142
47	2573	0	83	5229	415
51	1057,5	423	0	5569,5	0
56	2254	49	49	2401	147
57	2375	0	375	3312,5	187,5
58	2363	0	417	4100,5	69,5
67	1671	111,4	111,4	3286,3	389,9
68	1050	52,5	52,5	4042,5	52,5
69	2161,5	131	458,5	3799	0
70	1320	198	330	4488	264
73	1699,5	206	154,5	2884	206
74	2100	0	50	2800	50

TABELA 17 - RESULTADOS DA CONTAGEM ABSOLUTA DOS TIPOS LEUCOCITÁRIOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS DE CAMPO (conclusão)

81	2871	198	792	5940	99
85	2431	110,5	442	8066,5	0
200	5205	0	867,5	11277,5	0
201	2898	189	63	2646	504
300	2576	241,5	724,5	4266,5	241,5
301	3276	0	819	4914	91
403	1027	395	869	5609	0
503	1344	256	64	4736	0
603	1118	0	86	7224	172
700	5856,5	0	110,5	4641	442
901	2387	108,5	108,5	8246	0
906	1545	103	618	7828	206
907	2703	79,5	79,5	5088	0
911	10400	0	162,5	5200	487,5
917	1984,5	189	189	7087,5	0
918	4900	0	200	4800	100
921	2808	0	576	3456	360
1001	3600	0	160	4240	0
1003	786	196,5	65,5	5174,5	327,5
1103	4290	877,5	97,5	4485	0
1301	3268	86	258	4988	0
1401	3104	0	485	5820	291
1403	5160	86	0	3268	86
1503	6198,5	1138,5	126,5	5060	126,5
1603	6047,5	1622,5	147,5	6637,5	295
1701	3213	0	378	5859	0
1803	936	24	0	1320	120
1901	2106	78	234	5148	234
1903	1210	27,5	137,5	1265	110
2602	2295	459	0	4896	0

3.8.3 Dados Bioquímicos

3.8.3.1 Proteína plasmática

Na tabela 18 encontram-se inclusos os resultados da dosagem de proteína plasmática de cada amostra sanguínea analisada.

TABELA 18 - RESULTADOS DA DOSAGEM DE PROTEÍNA PLASMÁTICA CONTIDA NAS AMOSTRAS DE CAMPO

Nº DO ANIMAL	PROTEÍNA PLASMÁTICA g/dL.	Nº DO ANIMAL	PROTEÍNA PLASMÁTICA g/dL.
08	8,0	301	8,0
12	8,4	403	7,0
23	7,8	503	6,6
24	8,2	603	7,2
27	9,2	700	8,8
33	8,2	901	7,4
34	8,8	906	8,6
43	7,0	907	7,8
45	8,6	911	8,4
47	8,6	917	8,2
51	7,8	918	7,4
56	8,0	921	7,8
57	7,8	1001	7,6
58	7,8	1003	6,6
67	8,0	1103	6,4
68	8,0	1301	8,0
69	8,2	1401	7,6
70	7,2	1403	6,8
73	7,8	1503	6,4
74	7,8	1603	6,4
81	7,6	1701	8,2
85	8,0	1803	6,8
200	8,0	1901	7,6
201	7,8	1903	6,8
300	8,4	2602	6,2

3.8.3.2 Fibrinogênio

A tabela 19 mostra os resultados da estimativa de fibrinogênio das amostras testadas.

TABELA 19 - ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE FIBRINOGÊNIO
(continua)

Nº DO ANIMAL	FIBRINOGÊNIO mg/dL	Nº DO ANIMAL	FIBRINOGÊNIO mg/dL
08	600	301	400
12	400	403	400
23	600	503	400

TABELA 19 - ESTIMATIVA DO CONTEÚDO DE FIBRINOGÊNIO
(conclusão)

24	400	603	400
27	600	700	400
33	400	901	200
34	200	906	600
43	400	907	200
45	400	911	400
47	400	917	400
51	200	918	200
56	200	921	400
57	400	1001	400
58	400	1003	400
67	400	1103	400
68	400	1301	400
69	400	1401	200
70	200	1403	200
73	200	1503	200
74	600	1603	400
81	400	1701	400
85	400	1803	400
200	400	1901	200
201	600	1903	400
300	600	2602	400

4 DISCUSSÃO

4.1 PROVA DE AGID

Neste estudo, o critério de escolha do grupo de análise baseou-se na presença da infecção natural pelo VLB, que foi detectada previamente pela prova de AGID no rebanho bovino selecionado, quando se comparou um antígeno produzido no TECPAR com outro importado.

A soroconversão de 7 amostras (números 12, 33, 56, 57, 67, 68 e 74) oriundas do referido rebanho observada entre a primeira e a segunda análises, em 2000 e em 2003 respectivamente, pode ser explicada pela alta probabilidade de transmissão viral em condições naturais, seja por contato, por insetos hematófagos, pelo leite, colostro e outras secreções, por agulhas e instrumentos cirúrgicos, etc., conforme descrito por BEER, 1988. Este autor assinala ainda que a intensidade com que os animais adquirem a infecção é influenciada essencialmente pelas condições de manejo empregadas na propriedade em questão.

Das outras 11 amostras (números 08, 23, 24, 27, 34, 43, 45, 47, 51 70 e 73) do mesmo rebanho, que foram reativas por ocasião das 2 análises, 5 delas (números 08, 43, 45, 47 e 51) apresentaram diferenças na intensidade das reações, expressando em 2000 um resultado positivo passando para fracopositivo em 2003.

Essas diferenças provavelmente expressam diferentes títulos de anticorpos, pois, segundo CORRÊA e CORRÊA (1992), uma vez estabelecida a infecção (pela transferência de linfócitos infectados de um indivíduo para outro), segue-se o desenvolvimento de anticorpos circulantes em maiores ou menores títulos durante toda a vida do animal. Também BURRIDGE et al. (1982) demonstraram que, no período periparturiente, ocorre uma queda significativa no título de anticorpos séricos direcionados ao VLB, provavelmente em decorrência da transferência dessas moléculas ao colostro, com uma elevação subsequente no primeiro mês após o parto. Dessa forma, pode-se concluir que o título de

anticorpos circulantes não é constante, podendo inclusive não ser detectado pela AGID, que é uma prova menos sensível, durante o período periparturiente.

Considerando somente a prova de AGID, a prevalência da infecção pelo VLB no rebanho estudado praticamente não sofreu alteração de 2000 (63,3 %) para 2003 (64 %). Sabe-se, no entanto, que o índice de disseminação pode estar associado positivamente à prevalência da infecção (RADOSTITS et al. 2002). Dessa forma, como a prevalência da infecção no rebanho é alta (mais de 60 %), seria esperado que houvesse um aumento da mesma no período compreendido entre 2000 e 2003, o que não ocorreu.

Em relação ao antígeno produzido no TECPAR, o mesmo foi licenciado em 2001 pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA que aprovou sua fabricação e comercialização, de acordo com o documento exposto na figura 12 na página a seguir.

Segundo informações da Divisão de Antígenos do TECPAR, o custo de produção (mão de obra direta e indireta, materiais e tributos) do kit para o diagnóstico da LEB contendo antígeno e soro controle específico (anti-soro) para o teste de 120 amostras é de R\$ 73,47. O número de doses já comercializadas do referido produto é apontado na tabela 20 abaixo.

TABELA 20 - COMERCIALIZAÇÃO DO ANTÍGENO PRODUZIDO NO TECPAR

PERÍODO	KITS COMERCIALIZADOS	DOSES COMERCIALIZADAS
2002	31	3.720
2003	37	4.440
2004 (até o mês de novembro)	83	9.960

FIGURA 12 - LICENÇA DO ANTÍGENO PARA DIAGNÓSTICO DA LEB

1ª VIA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

Ministério da Agricultura e do Abastecimento - MA
 Secretaria de defesa agropecuária - SDA
 Departamento de defesa animal - DDA
 Coordenação de fiscalização de produtos veterinários - CPV

LICENÇA DE PRODUTO DE USO VETERINÁRIO

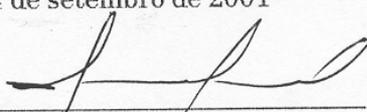
Ref. Processo MA- 21034/0697/2000-18 Licença nº 7.916/2001

Nos termos da legislação em vigor é emitida a presente licença para fabricação e comercialização do produto denominado **ANTÍGENO PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA**, de propriedade do **INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ - TECPAR - PR** e fabricado por **INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ - TECPAR - PR**, na forma liofilizada, nas apresentações o kit contém: 1 frasco ampola de vidro com 1 mL de antígeno liofilizado, 3 frascos ampola de vidro com 1 mL de soro controle negativo, 1 frasco ampola de vidro com 4 mL de diluente estéril. Todos os frascos são fechados com tampa de borracha e lacrados com badoque de alumínio e tendo como indicações o diagnóstico de leucose enzoótica bovina pelo método de "imunodifusão em gel de ágar".

FÓRMULA COMPLETA DO PRODUTO POR ML

Proteínas (P25) do capsídeo viral.....	63,0 mg
Glicoproteínas (GP 51) do envelope viral.....	1,8 mg

Esta licença é válida até 03 de setembro de 2011
 Brasília-DF, 04 de setembro de 2001


 Ricardo Rego Pamplona
 Coordenador - CPV

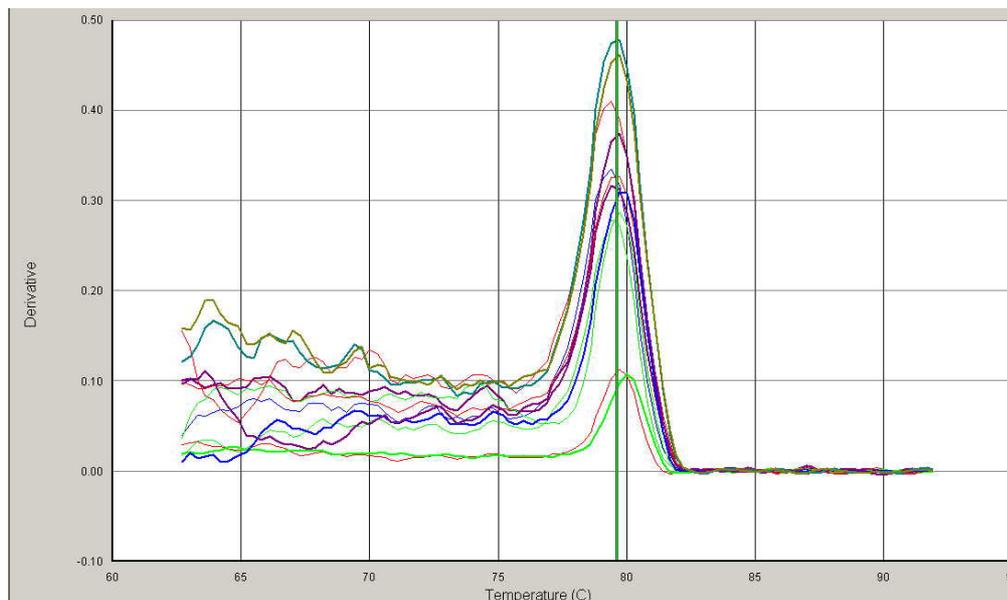
4.2 TÉCNICA DA PCR-TR

Segundo BALLAGI - PORDÁNY et al. (1992), muitos problemas podem ocorrer durante a execução da técnica de PCR, em função de sua elevada sensibilidade. Considera-se a contaminação cruzada entre as amostras e das amostras com produtos de amplificações anteriores como sendo o erro diagnóstico mais comum. Neste experimento, as reações foram preparadas em cabine com fluxo laminar e também se utilizou a PCR-TR, cuja metodologia específica foi apresentada no tópico 2.9, objetivando-se minimizar consideravelmente esse possível erro.

Da mesma forma, é de fundamental importância a verificação da especificidade dessa técnica. No estudo conduzido por CAMARGOS et al., publicado em 2003, o primeiro sobre a utilização da PCR para o diagnóstico da LEB no Brasil, a especificidade analítica do teste foi confirmada por restrição enzimática dos produtos da reação com Bam HI e também pela análise da seqüência dos nucleotídeos de 3 amostras.

No presente estudo, como o método empregado foi a PCR-TR, a especificidade da reação foi analisada pela curva de dissociação, apresentada na figura 13, a qual mostra a formação de um só pico, caracterizando a ausência de amplificação inespecífica. A curva indica também a temperatura em que os produtos da PCR se dissociam (em torno de 79 °C), liberando o fluoróforo SYBR[®] Green e provocando uma queda abrupta da fluorescência, representada pelo pico único. A presença de produtos inespecíficos, como por exemplo, iniciadores que se ligam entre si (“primer dimers”), formando fita dupla em que o SYBR[®] Green se adere, faria com que outros picos de dissociação se formassem, porém em temperatura distinta daquela em que os produtos específicos se dissociam, em função de seu tamanho e de sua composição também diferentes.

FIGURA 13 - CURVA DE DISSOCIAÇÃO DA PCR-TR



As 9 amostras negativas para a infecção pelo VLB na PCR-TR (números 33, 58, 73, 403, 700, 907, 1001, 1903 e 2602) foram também analisadas por meio dessa mesma metodologia, utilizando-se iniciadores específicos para a amplificação do fragmento de DNA que codifica o 18s, que é um RNA ribossomal presente nas células de mamíferos. Essa análise foi realizada com a finalidade de monitorar o processo de extração do DNA linfocitário bovino.

Embora vários grupos de pesquisadores selecionaram as seqüências dos iniciadores a partir da região do gene *env* (NAIF et al., 1990; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1992; KLINTEVALL et al., 1994; EAVES et al., 1994; FECHNER et al., 1996; CAMARGOS et al., 2003), optou-se nesse estudo por amplificar parte do gene *pol* do VLB. Conforme descrito por BALLAGI-PORDÁNY et al. (1992), as regiões *gag-p24* ou *pol*, devido ao seu alto grau de conservação, também podem ser escolhidas para selecionar os iniciadores. O gene *pol*, por ser altamente conservado foi considerado por JACOBS et al. (1992) um bom alvo para amplificação, mesmo na presença de diferenças existentes entre cepas distintas, ao contrário de outras regiões do genoma retroviral.

4.3 VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS DA AGID E DA PCR-TR

As figuras 14 e 15 apresentam respectivamente os valores de absorvância obtidos no teste ELISA em relação aos resultados das amostras de campo nas técnicas de AGID e de PCR-TR.

Evidencia-se nessas figuras uma maior identidade entre o teste ELISA e a prova de AGID do que entre aquele e a PCR-TR. Esse resultado já era esperado, visto que o teste ELISA e a prova de AGID detectam a resposta imune do hospedeiro em relação ao VLB, enquanto a PCR-TR identifica o genoma desse vírus integrado ao DNA dos linfócitos dos animais infectados.

FIGURA 14 - VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA VERSUS CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS NA AGID

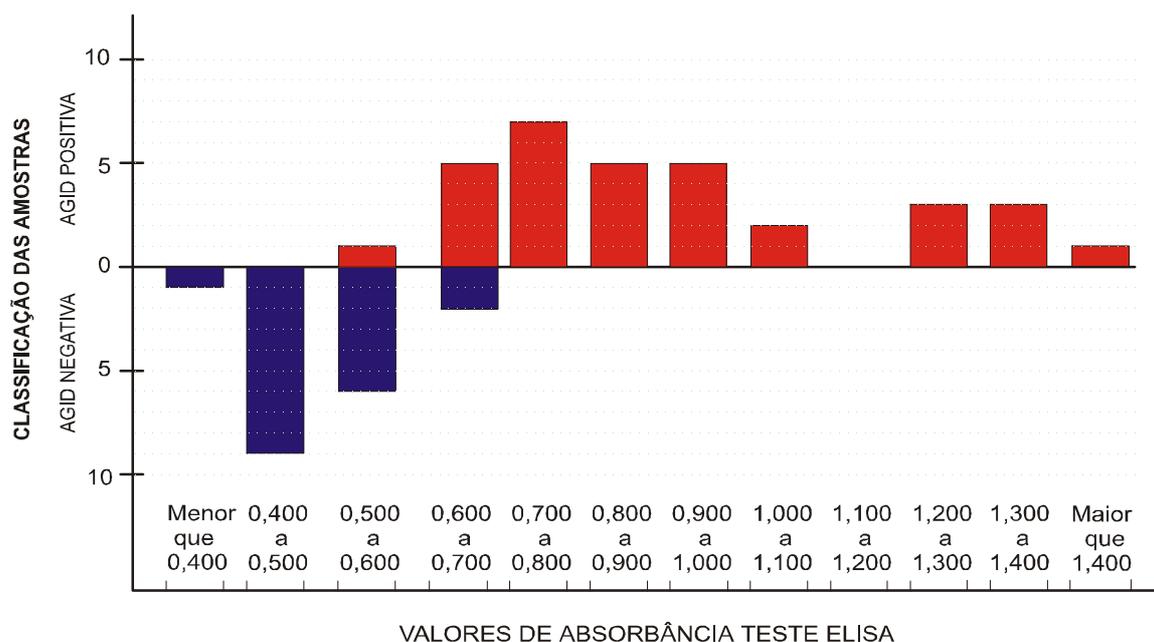
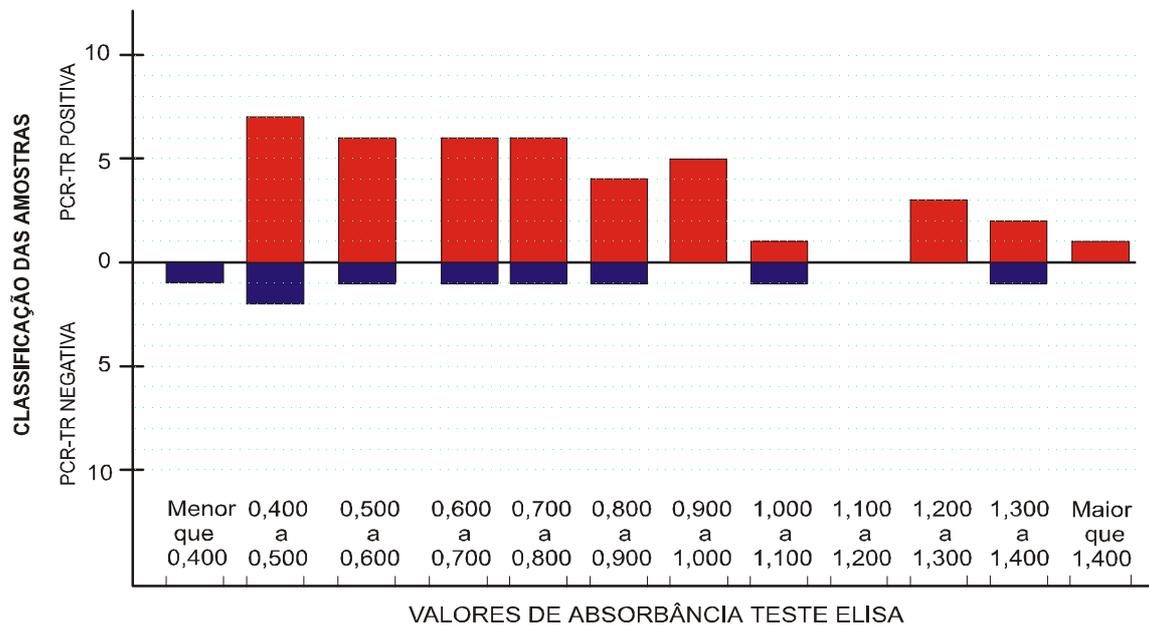


FIGURA 15 - VALORES DE ABSORBÂNCIA NO TESTE ELISA VERSUS CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS NA PCR-TR



4.4 DETERMINAÇÃO DE UM PONTO DE CORTE ÚNICO PARA O TESTE ELISA

Visto que 18 % das amostras testadas apresentaram valores de absorvância incluídos no intervalo entre 0,500 e 0,650 (“gray zone” do teste ELISA) considerado como resultado indeterminado, definiu-se um ponto de corte único para esse teste.

Para tal, selecionou-se um espectro de pontos de corte de 0,450 a 0,700 e calculou-se a sensibilidade e a especificidade do teste ELISA, em porcentagem, em relação a cada um dos pontos, de acordo com as fórmulas apresentadas a seguir:

$$\text{Sensibilidade diagnóstica} = \frac{\text{verdadeiros positivos} \times 100}{\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}}$$

$$\text{Especificidade diagnóstica} = \frac{\text{verdadeiros negativos} \times 100}{\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos}}$$

Para o cálculo da sensibilidade e da especificidade do teste ELISA, comparou-se os resultados desse teste com os resultados conjuntos das amostras nas técnicas de PCR-TR e AGID, ou seja, considerou-se as 4 amostras com resultados negativos na PCR-TR e positivos na AGID como amostras reagentes. Dessa forma, conforme mostra a tabela 11 apresentada nos resultados, avaliou-se como positivas as 45 amostras reagentes em pelo menos uma das provas em questão (PCR-TR e AGID) e como negativas as 5 amostras não reagentes em ambas.

A seguir, na tabela 21, são apresentados como foram considerados os parâmetros verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN) para o cálculo da sensibilidade e da especificidade do teste ELISA.

TABELA 21 - PARÂMETROS CONSIDERADOS PARA O CÁLCULO DA SENSIBILIDADE E DA ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA

TESTES	ELISA	POS	NEG	TOTAL
PCR-TR	POS	VP	FN	45
AGID	NEG	FP	VN	5
TOTAL GERAL				50

Legenda: **POS** - resultado positivo **NEG** - resultado negativo

Com base na tabela anterior, preencheu-se os respectivos parâmetros, considerando os resultados conjuntos da PCR-TR e da AGID em relação aos resultados do teste ELISA para cada ponto de corte selecionado.

Assim, para um ponto de corte de 0,450, por exemplo, estabeleceu-se um resultado positivo para amostras cujo valor de absorvância obtido foi igual ou maior que 0,450 e um resultado negativo para aquelas em que o valor de absorvância foi menor que 0,450. Para os outros pontos de corte selecionados (0,500, 0,550, 0,560, 0,570, 0,580, 0,590, 0,600, 0,650 e 0,700) utilizou-se esse mesmo critério.

A tabela 22 adiante mostra os resultados conjuntos da PCR-TR e da AGID e do teste ELISA, além do valor de sensibilidade e especificidade para cada um dos 10 pontos de corte selecionados.

TABELA 22 - RESULTADOS OBTIDOS E VALORES DE SENSIBILIDADE E DE ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA PARA CADA PONTO DE CORTE SELECIONADO (continua)

P.C. 0,450	ELISA	POS	NEG	TOTAL	P.C. 0,500	ELISA	POS	NEG	TOTAL
PCR-TR AGID	POS	42	3	45	PCR-TR AGID	POS	38	7	45
	NEG	3	2	5		NEG	2	3	5
TOTAL		45	5	50	TOTAL		40	10	50
PONTO DE CORTE DE 0,450 SENSIBILIDADE: 93,3 % ESPECIFICIDADE: 40,0%					PONTO DE CORTE DE 0,500 SENSIBILIDADE: 84,4 % ESPECIFICIDADE: 60,0%				
P.C. 0,550	ELISA	POS	NEG	TOTAL	P.C. 0,560	ELISA	POS	NEG	TOTAL
PCR-TR AGID	POS	36	9	45	PCR-TR AGID	POS	34	11	45
	NEG	1	4	5		NEG	1	4	5
TOTAL		37	13	50	TOTAL		35	15	50
PONTO DE CORTE DE 0,550 SENSIBILIDADE: 80,0 % ESPECIFICIDADE: 80,0%					PONTO DE CORTE DE 0,560 SENSIBILIDADE: 75,6 % ESPECIFICIDADE: 80,0%				
P.C. 0,570	ELISA	POS	NEG	TOTAL	P.C. 0,580	ELISA	POS	NEG	TOTAL
PCR-TR AGID	POS	33	12	45	PCR-TR AGID	POS	33	12	45
	NEG	1	4	5		NEG	1	4	5
TOTAL		34	16	50	TOTAL		34	16	50
PONTO DE CORTE DE 0,570 SENSIBILIDADE: 73,3 % ESPECIFICIDADE: 80,0%					PONTO DE CORTE DE 0,580 SENSIBILIDADE: 73,3 % ESPECIFICIDADE: 80,0%				
P.C. 0,590	ELISA	POS	NEG	TOTAL	P.C. 0,600	ELISA	POS	NEG	TOTAL
PCR-TR AGID	POS	33	12	45	PCR-TR AGID	POS	32	13	45
	NEG	1	4	5		NEG	1	4	5
TOTAL		34	16	50	TOTAL		33	17	50
PONTO DE CORTE DE 0,590 SENSIBILIDADE: 73,3 % ESPECIFICIDADE: 80,0%					PONTO DE CORTE DE 0,600 SENSIBILIDADE: 71,1 % ESPECIFICIDADE: 80,0%				

TABELA 22 - RESULTADOS OBTIDOS E VALORES DE SENSIBILIDADE E DE ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA PARA CADA PONTO DE CORTE SELECIONADO (conclusão)

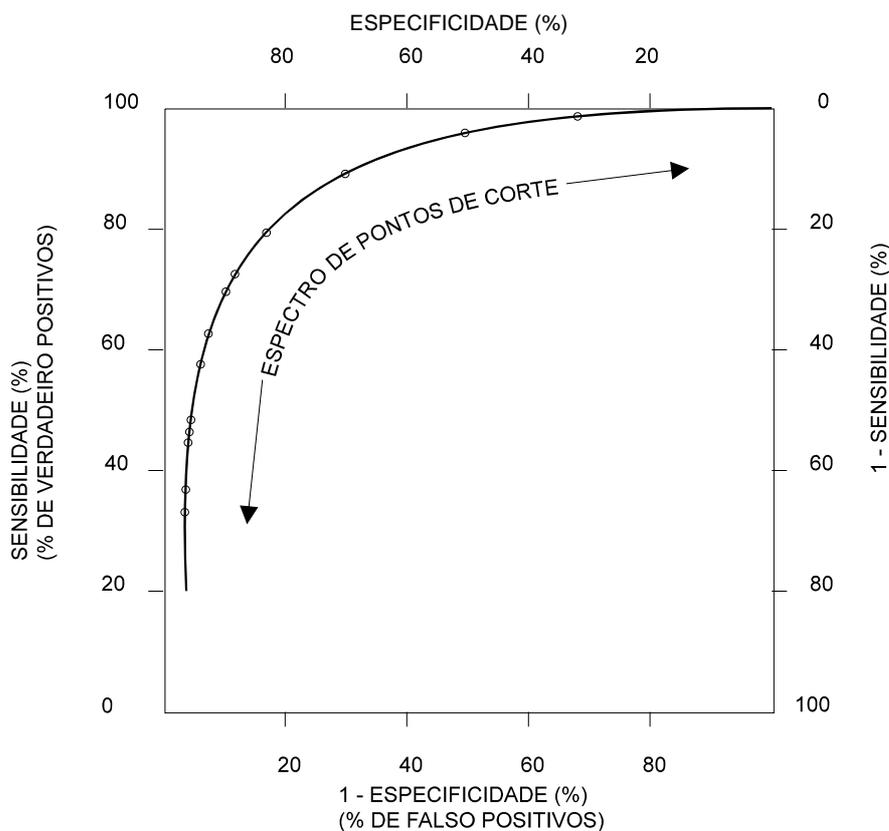
P.C. 0,650	ELISA	POS	NEG	TOTAL	P.C. 0,700	ELISA	POS	NEG	TOTAL
PCR-TR AGID	POS	31	14	45	PCR-TR AGID	POS	26	19	45
	NEG	0	5	5		NEG	0	5	5
TOTAL		31	19	50	TOTAL		26	24	50
PONTO DE CORTE DE 0,650					PONTO DE CORTE DE 0,700				
SENSIBILIDADE: 68,9 % ESPECIFICIDADE: 100,0%					SENSIBILIDADE: 57,8 % ESPECIFICIDADE: 100,0%				

Tendo em mãos a sensibilidade e a especificidade de cada ponto de corte, construiu-se uma curva denominada “receiver operator characteristic” (ROC), a qual descreve a acurácia de um teste em um espectro de pontos de corte. Por expressar a relação entre a sensibilidade e a especificidade do teste, a mesma pode ser usada para auxiliar na decisão de qual é o melhor ponto de corte (FLETCHER et al., 1989).

Essa curva é construída pela representação da taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) contra a taxa de falso positivos (1 menos especificidade). Os valores nos eixos deslocam-se de uma proporção de 0 % a 100 %, conforme mostra a figura 16 (FLETCHER et al., 1989).

Os pontos de corte com bom poder discriminatório concentram-se no canto superior esquerdo da curva ROC; para eles, à medida que a sensibilidade diminui, existe pouca ou nenhuma perda na especificidade, o que deixa de ocorrer quando altos níveis de sensibilidade são alcançados (FLETCHER et al., 1989).

FIGURA 16 - CURVA ROC



De acordo com o princípio formulado anteriormente sobre os pontos de corte com bom poder discriminatório, escolheu-se o valor de 0,550 como o ponto de corte do teste ELISA desenvolvido nesse estudo, em função do equilíbrio entre a sensibilidade (80 %) e a especificidade (80 %) que o mesmo fornece. Com um valor menor de ponto de corte aumentaria a sensibilidade do teste, mas haveria perda na especificidade do mesmo. Com valores maiores de ponto de corte, a especificidade ficaria estável, no entanto, haveria perda na sensibilidade.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

4.5.1 Correlação Entre as Técnicas de AGID e PCR-TR

Devido à maior sensibilidade da PCR em relação aos testes sorológicos relatada por vários autores (NAIF et al., 1990; JACOBS et al., 1992; SHERMAN

et al., 1992; AGRESTI et al., 1993; KELLY et al., 1993; KLINTEVALL et al., 1994; FECHNER et al., 1996), considerou-se neste experimento a PCR-TR como o teste “gold standard”.

No trabalho realizado por CAMARGOS et al. (2003), comparou-se as técnicas de PCR e AGID para a detecção da infecção pelo VLB e obteve-se uma concordância de 73,80 % entre as mesmas, que foi considerada moderada por esses autores, tendo em vista outros estudos que apontaram uma associação entre os 2 testes muito próxima de 100 % (NAIF et al., 1990; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1992).

CAMARGOS et al. (2003) consideraram o teste de AGID como “gold standard”, tendo calculado em relação ao mesmo, a sensibilidade e a especificidade diagnóstica da PCR em 87 % e 62 % respectivamente. Esses autores concluíram que a sensibilidade da PCR deveria ser melhorada.

No presente trabalho, a concordância entre as técnicas de AGID e PCR-TR foi de 66 %. Das 50 amostras testadas, 17 apresentaram resultados divergentes, sendo 13 positivas na PCR-TR e negativas na AGID e 4 negativas na PCR-TR e positivas na AGID.

Uma maior reatividade das amostras na PCR-TR do que no teste de AGID era esperada, em função da maior sensibilidade daquela técnica, como referenciado acima. A ausência de reatividade na PCR-TR em amostras positivas na AGID e em outros testes para detecção de anticorpos também foi descrita em diversas pesquisas (MURTAUGH et al., 1991; JACOBS et al., 1992; AGRESTI et al., 1993; EAVES et al., 1994; FECHNER et al., 1996; CAMARGOS et al., 2003). Esse fato, segundo relatado por CAMARGOS et al., 2003, com embasamento em outros artigos científicos, poderia ser explicado pela presença de inibidores da Taq DNA polimerase nas amostras de sangue, pela ausência do DNA proviral do VLB nos linfócitos circulantes, pelo pequeno número de cópias do provírus ou em função de infecção restrita a órgãos linfóides.

4.5.2 Correlação Entre a Técnica de PCR-TR e os Testes de AGID e ELISA

Considerando a aplicação do ponto de corte de 0,550 para o teste ELISA, houve concordância entre o resultados dos 3 ensaios em 62 % das amostras, sendo 27 positivas e 4 negativas, conforme exposto na tabela 23.

TABELA 23 - RESULTADOS CONCORDANTES NAS TRÊS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DESENVOLVIDAS

Nº DO ANIMAL	RESULTADOS AGID	VALORES DE ABS. ELISA	RESULTADOS ELISA	RESULTADOS PCR - TR
08	FRACO POSITIVO	0,653	POSITIVO	POSITIVO
12	FRACO POSITIVO	0,890	POSITIVO	POSITIVO
23	POSITIVO	0,787	POSITIVO	POSITIVO
24	POSITIVO	1,280	POSITIVO	POSITIVO
27	POSITIVO	0,976	POSITIVO	POSITIVO
34	POSITIVO	0,982	POSITIVO	POSITIVO
43	FRACO POSITIVO	0,729	POSITIVO	POSITIVO
45	FRACO POSITIVO	1,080	POSITIVO	POSITIVO
47	FRACO POSITIVO	1,334	POSITIVO	POSITIVO
51	FRACO POSITIVO	0,904	POSITIVO	POSITIVO
56	POSITIVO	0,764	POSITIVO	POSITIVO
57	FRACO POSITIVO	0,632	POSITIVO	POSITIVO
67	POSITIVO	0,655	POSITIVO	POSITIVO
68	POSITIVO	1,268	POSITIVO	POSITIVO
69	POSITIVO	0,710	POSITIVO	POSITIVO
70	POSITIVO	0,764	POSITIVO	POSITIVO
74	FRACO POSITIVO	0,914	POSITIVO	POSITIVO
81	FRACO POSITIVO	1,206	POSITIVO	POSITIVO
85	POSITIVO	0,662	POSITIVO	POSITIVO
200	FRACO POSITIVO	0,824	POSITIVO	POSITIVO
300	POSITIVO	0,692	POSITIVO	POSITIVO
403	NEGATIVO	0,453	NEGATIVO	NEGATIVO
700	NEGATIVO	0,530	NEGATIVO	NEGATIVO
901	POSITIVO	1,512	POSITIVO	POSITIVO
906	POSITIVO	1,376	POSITIVO	POSITIVO
911	POSITIVO	0,944	POSITIVO	POSITIVO
917	FRACO POSITIVO	0,856	POSITIVO	POSITIVO
921	FRACO POSITIVO	0,735	POSITIVO	POSITIVO
1803	FRACO POSITIVO	0,818	POSITIVO	POSITIVO
1903	NEGATIVO	0,406	NEGATIVO	NEGATIVO
2602	NEGATIVO	0,387	NEGATIVO	NEGATIVO

As amostras 57 e 700, cujos valores de absorbância estão em negrito na tabela anterior, apresentaram resultado indeterminado antes da aplicação do ponto de corte único ao teste ELISA.

Os resultados divergentes, obtidos em 19 amostras testadas nas 3 provas em questão, são apresentados na tabela 24.

TABELA 24 - RESULTADOS DIVERGENTES NAS TRÊS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DESENVOLVIDAS

Nº DO ANIMAL	RESULTADOS AGID	VALORES DE ABS. ELISA	RESULTADOS ELISA	RESULTADOS PCR - TR
33	POSITIVO	1,325	POSITIVO	NEGATIVO
58	POSITIVO	0,751	POSITIVO	NEGATIVO
73	FRACO POSITIVO	0,860	POSITIVO	NEGATIVO
201	NEGATIVO	0,593	POSITIVO	POSITIVO
301	NEGATIVO	0,555	POSITIVO	POSITIVO
503	NEGATIVO	0,455	NEGATIVO	POSITIVO
603	NEGATIVO	0,554	POSITIVO	POSITIVO
907	POSITIVO	1,010	POSITIVO	NEGATIVO
918	FRACO POSITIVO	0,522	NEGATIVO	POSITIVO
1001	NEGATIVO	0,633	POSITIVO	NEGATIVO
1003	NEGATIVO	0,434	NEGATIVO	POSITIVO
1103	NEGATIVO	0,421	NEGATIVO	POSITIVO
1301	NEGATIVO	0,517	NEGATIVO	POSITIVO
1401	NEGATIVO	0,483	NEGATIVO	POSITIVO
1403	NEGATIVO	0,480	NEGATIVO	POSITIVO
1503	NEGATIVO	0,451	NEGATIVO	POSITIVO
1603	NEGATIVO	0,430	NEGATIVO	POSITIVO
1701	NEGATIVO	0,688	POSITIVO	POSITIVO
1901	NEGATIVO	0,565	POSITIVO	POSITIVO

Da mesma forma que na tabela 23, as amostras 201, 301, 603, 918, 1001, 1301 e 1901, cujos valores de absorvância estão em negrito, apresentaram resultado indeterminado, quando se considerou o intervalo de “gray zone” para interpretação do teste ELISA.

Ao se observar os resultados divergentes, nota-se que os testes de AGID e ELISA falharam na identificação de 8 animais infectados, considerando que os mesmos apresentaram reatividade na PCR-TR. Desses 8 animais, 6 eram bezerros de 3 a 5 meses de idade na época da colheita de sangue (amostras 503, 1003, 1103, 1403, 1503 e 1603) enquanto os outros 2 (amostras 1301 e 1401) contavam com pouco mais de 2 anos.

O estudo desenvolvido por AGRESTI et al. (1993) explica o resultado que foi obtido especificamente pelos 6 bezerros. Esses autores avaliaram o uso da PCR para o diagnóstico da infecção pelo VLB em bezerros ao nascimento e aos 6

meses de idade e chegaram à conclusão que as provas sorológicas realizadas ao nascimento ou antes dos 6 meses de idade podem fornecer tanto resultados falso positivos como falso negativos, enquanto que os resultados obtidos pela PCR são perfeitamente equiparados ao nascimento e aos 6 meses de idade.

Conforme descrito por AGRESTI et al. (1993), as reações falso positivas antes dos 6 meses de idade, ou seja, positiva para a presença de anticorpos, mas negativa na PCR, representam os animais não infectados com resposta de anticorpos colostrais. Já o inverso, a ausência de reação sorológica e reatividade na PCR, como os resultados observados nesse trabalho apresentados pelos 6 bezerros, seria presumivelmente decorrente do fato desses animais terem se infectado tardiamente por via placentária e ainda não terem desenvolvido uma resposta imune madura, o que impediria que as provas imunológicas revelassem a infecção. Por essa razão, esses pesquisadores acreditam que, de maneira geral, somente à idade de 6 meses haja uma correlação significativa entre a presença de anticorpos no soro e a real infecção pelo VLB.

Quanto aos 2 animais mais velhos, com mais de 2 anos de idade, considera-se que os resultados obtidos sejam uma consequência da maior sensibilidade da técnica de PCR em relação aos testes sorológicos, como já foi referenciado no tópico 4.5.1.

Em contrapartida, em 4 animais (amostras 33, 58, 73 e 907) que apresentaram anticorpos detectáveis pela AGID e pelo ELISA, não foi possível a amplificação de parte do DNA proviral pela PCR-TR nos linfócitos circulantes. As explicações para esse fato foram anteriormente relatadas no tópico 4.5.1.

Uma 5^a amostra (número 1001), também negativa na PCR-TR, apresentou positividade no teste ELISA, mas não na AGID. O valor de absorbância dessa amostra foi de 0,633, sendo considerado como resultado indeterminado antes do estabelecimento do ponto de corte. Dessa forma, após considerar-se o valor de 0,550 como ponto de corte, o resultado dessa amostra no teste ELISA deve ser interpretado como falso positivo, parâmetro este inversamente proporcional à especificidade do teste., que foi calculada em 80 %.

No entanto, apesar da aplicação de um ponto de corte de 0,550 ao teste ELISA ter fornecido um resultado falso positivo, em outras 4 amostras (201, 301, 603 e 1901), esse mesmo ponto de corte permitiu a interpretação correta desse teste em relação ao resultado da PCR-TR, ou seja, essas amostras que foram não reagentes na AGID e reagentes na PCR-TR, apresentaram resultado positivo também no teste ELISA. Igualmente para a amostra 1701, esse teste evidenciou uma maior sensibilidade que a AGID, mesmo antes da aplicação do ponto de corte de 0,550.

Segundo NAIF et al. (1990), a AGID e o teste ELISA são as técnicas mais comumente utilizadas para a detecção da infecção pelo VLB, apresentando a 2^a maior sensibilidade que a 1^a. A prova de AGID tem sido rotineiramente empregada em todo o mundo pelas Autoridades em Sanidade Animal, embora tenha uma série de limitações, tais como o fato de não identificar a presença do vírus nas fases iniciais da infecção e não ser suficientemente sensível quando amostras fraco-positivas estão sendo testadas, gerando uma alta proporção de resultados falsos negativos.

O contrário da situação acima relatada ocorreu com a amostra 918, que foi interpretada como negativa no teste ELISA, mas apresentou-se reagente na AGID e na PCR-TR. A presença desse resultado, considerado falso negativo, é possível já que a sensibilidade do teste ELISA aplicando-se o ponto de corte de 0,550 foi de 80 %. Antes da aplicação do ponto de corte, o valor de absorbância dessa amostra (0,522) foi considerado um resultado indeterminado no teste ELISA.

Considerando ainda os resultados das provas imunológicas AGID e ELISA, desenvolvidas no presente trabalho, obteve-se entre as mesmas uma concordância de 86 %, havendo divergência em 7 amostras. Das amostras com resultados discordantes, 6 apresentaram resultado negativo na AGID e positivo no teste ELISA (201, 301, 603, 1001, 1701 e 1901), sendo que em 5 destas, a PCR-TR foi concordante com o último teste. No entanto, para a amostra 1001, o resultado obtido na técnica molecular foi correlato àquele obtido na AGID.

Também para a amostra 918, que apresentou reatividade na AGID, mas não no teste ELISA, o resultado da PCR-TR foi concordante com o da AGID.

Do total de amostras analisadas neste estudo, o índice de positividade na PCR-TR, no teste ELISA e na prova de AGID foi de 82 %, 74 % e 64 % respectivamente, ou seja, a PCR-TR apresentou 8 % e 18 % a mais de resultados positivos do que o teste ELISA e do que a AGID.

Também FECHNER et al. (1996) obtiveram resultados semelhantes, já que em seu trabalho de pesquisa, esses autores relataram que a PCR forneceu um número maior de resultados positivos, 10 % e 17,7 % a mais quando comparada aos testes ELISA e de AGID respectivamente, o que comprova a sensibilidade mais elevada da técnica imunoenzimática em relação àquela baseada na reação de precipitação entre antígeno e anticorpo.

4.6 ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A amostra 907 apresentou em conjunto os 3 principais parâmetros da série vermelha (VG, Hb, e número de eritrócitos) em seus limites inferiores, podendo caracterizar o início de um processo de anemia. Essa amostra foi reagente nas provas imunológicas, porém negativa na PCR-TR; inclusive o valor de absorbância no teste ELISA foi bastante elevado, 1,010. Em nenhuma outra amostra estudada observou-se alteração no eritrograma.

O VLB não afeta as séries eritrocítica e megacariocítica, portanto os bovinos acometidos por esse agente não apresentam anemia nem trombocitopenia. No entanto, a forma entérica da enfermidade é freqüentemente caracterizada por infiltração de células neoplásicas na submucosa do abomaso, com apresentação de úlceras e hemorragia em muitos casos clínicos, fato que pode ocasionar, de modo secundário, anemia (CORRÊA e CORRÊA, 1992).

Também o animal que manifestou a LEB em sua forma clínica na propriedade estudada (OLLHOFF et al., 2003) apresentou um VG (hematócrito ou proporção de massa eritrocitária) de 21%, caracterizando uma anemia em

decorrência de ulcerações múltiplas no abomaso, em função do envolvimento de todo o sistema gástrico pelo tecido linfóide neoplásico.

No estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2000) no estado de São Paulo, o eritrograma permaneceu dentro da faixa de normalidade para a raça em questão nos 3 grupos de bovinos testados, a saber: animais não reagentes aos antígenos do VLB, animais reagentes aos antígenos do VLB sem linfocitose persistente e animais não reagentes aos antígenos do VLB com linfocitose persistente.

Quanto as alterações do quadro leucocitário, 8 animais (24, 43, 200, 911, 1503, 1603, 1803 e 1903) apresentaram modificações patológicas quanto ao número de alguns tipos de glóbulos brancos.

Dessas amostras, apenas a de número 1903 não apresentou reatividade nos 3 métodos de diagnóstico (AGID, ELISA e PCR-TR). Já as amostras 24, 43, 200, 911 e 1803 foram reagentes em todas as provas e as de número 1503 e 1603 foram negativas nos testes imunológicos, porém positivas na PCR-TR.

As amostras 1803 e 1903 apresentaram leucopenia (2400 e 2750 leucócitos por mm^3 de sangue respectivamente) em função de linfopenia absoluta.

Todas as amostras restantes apresentaram leucocitose, sendo 3 decorrentes de neutrofilia madura (911, 1503 e 1603) e 3 de linfocitose (24, 43 e 200).

Dos animais com neutrofilia madura, 2 (1503 e 1603) apresentaram desvio nuclear de neutrófilos a esquerda (DNNE) caracterizando um quadro inflamatório agudo, enquanto que no terceiro (911) não foi observada essa alteração, o que pressupõe uma neutrofilia fisiológica.

Nas amostras 24 e 43 observou-se respectivamente linfocitose relativa (90 % e 85 %) e absoluta, (31.320 linfócitos por mm^3 de sangue e 34.212 linfócitos por mm^3 de sangue). A amostra 200 apresentou uma proporção de linfócitos dentro dos valores normais para a espécie (65%), porém foi observada uma linfocitose absoluta (11.277 linfócitos por mm^3 de sangue).

Segundo GARCIA et al. (1991), desde o início do século XX sabia-se que os animais afetados pela LEB apresentavam linfocitose, sendo esta alteração

bastante utilizada como recurso auxiliar no diagnóstico da enfermidade pelo emprego das “chaves leucométricas”.

Também esses autores, realizando o leucograma em bovinos reagentes e não reagentes à AGID, mostraram que apenas os linfócitos apresentaram número estatisticamente significativo aumentado nos animais reagentes, os quais mostraram igualmente contagens significativamente maiores de linfócitos atípicos.

De acordo com CORRÊA e CORRÊA (1992), nas fazendas-problema os animais doentes podem apresentar linfocitose franca, podendo ir até 60% do efetivo. Hemogramas dos casos leucêmicos têm mostrado desde 30.000 até casos raros com 400.000 a 500.000 leucócitos por mm^3 . Os exames hematológicos podem ajudar a confirmar o diagnóstico se houver forte leucocitose com linfocitose; entretanto, sua negatividade em casos individuais não afasta a suspeita, em função da alta proporção de casos aleucêmicos.

A tabela a seguir, apresentada por CORRÊA e CORRÊA (1992), correlaciona a presença, suspeita ou ausência da LEB em função do número de linfócitos por mm^3 de sangue, conforme a idade do animal.

TABELA 25 - INDICATIVO DA PRESENÇA DA LEB CONSIDERANDO O NÚMERO DE LINFÓCITOS CONFORME A IDADE DO ANIMAL

ANOS DE IDADE	MILHARES DE LINFÓCITOS / mm^3 DE SANGUE		
	NORMAIS	SUSPEITOS	DOENTES
0 - 1	< 10	10 - 13	> 13
1 - 2	< 9	9 - 12	> 12
2 - 3	< 7,5	7,5 - 10	> 10
3 - 6	< 6,5	6,5 - 9	> 9
> 6	< 5,5	5,5 - 7,5	> 7,5

No trabalho realizado por OLIVEIRA et al. (2000), em que a linfocitose persistente foi determinada por meio de 4 contagens leucolinfocitárias, sugeriu-se que animais com mais de 3,7 anos de idade e com contagem absoluta de linfócitos acima de 8000 por mm^3 sejam considerados linfocitóticos.

Nesse mesmo estudo, observou-se uma diminuição das proteínas plasmáticas totais e da fração gamaglobulina no sangue periférico de bovinos reagentes aos antígenos do VLB com e sem linfocitose persistente, podendo significar uma queda da imunidade humoral, já que em outros relatos na literatura observou-se uma diminuição de imunoglobulinas do tipo IgM no soro de bovinos infectados com e sem linfocitose persistente.

No entanto, os resultados anteriores foram discordantes daqueles obtidos por BIRGEL JÚNIOR et al. (2001), que observaram não haver diferença entre os valores séricos do proteinograma e da concentração sérica de imunoglobulinas dos tipos IgG e IgM analisados em animais não reagentes e reagentes ao VLB com e sem linfocitose persistente.

Neste experimento, 9 amostras apresentaram hipoproteinemia (503, 1003, 1103, 1403, 1503, 1603, 1803, 1903 e 2602). Entre elas, com exceção da 1903 e da 2602, todas foram reagentes em pelo menos um dos 3 métodos de diagnóstico. Outras 3 amostras (27, 34 e 700) apresentaram hiperproteinemia, sendo as 2 primeiras reagentes e a de número 700 não reagente em todas as provas de detecção da infecção pelo VLB.

De todas as amostras com concentração de proteínas plasmáticas totais aquém do valor de referência para a espécie, 4 apresentaram concomitantemente alterações no leucograma: as que apresentaram neutrofilia patológica (1503 e 1603) e aquelas em que uma linfopenia foi observada (1803 e 1903).

Conforme descrito por SMITH et al (1994), os níveis de fibrinogênio têm sido inconsistentes em casos de animais com linfossarcoma enzoótico, portanto sua determinação pode ser útil apenas para a diferenciação de um abscesso. No

gado bovino, a hiperfibrinogenemia é o melhor indicador de doença inflamatória (JAIN et al., 1993).

Neste experimento nenhuma amostra apresentou elevação da concentração de fibrinogênio; já o seu decréscimo esteve presente em 12 delas.

As amostras 1403 e 1503 apresentaram diminuição da concentração de fibrinogênio em associação com hipoproteinemia, alterações que podem ser decorrentes de dano hepático.

4.7 O USO DOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA O CONTROLE DA LEB NO BRASIL

Em junho de 2003, a Comissão das Comunidades Europeias estabeleceu o estatuto de oficialmente indenes de tuberculose, brucelose e leucose enzoótica bovina a determinados Estados-Membros e regiões dos Estados-Membros em relação ao gado bovino (JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA, 25.06.2003).

Com respeito a LEB foram declarados oficialmente livres da enfermidade os seguintes Estados-Membros: Bélgica, Dinamarca, Alemanha, Espanha, França, Irlanda Luxemburgo, Países Baixos, Áustria, Finlândia, Suécia, e Reino Unido, além de 20 províncias de 5 regiões da Itália.

Segundo AGRETI et al.(1993) a implementação de medidas para detectar, controlar e finalmente erradicar a infecção pelo VLB é de grande importância, pois vários países restringem de maneira rigorosa a importação de gado bovino infectado pelo VLB.

O estabelecimento de um programa de controle da LEB é premente no Brasil, principalmente em função da exportação de produtos de origem animal para os Estados-Membros da União Europeia.

De acordo com CORRÊA e CORRÊA (1992), o Escritório Internacional de Epizootias recomenda que todas as autoridades veterinárias estabeleçam medidas de controle para a leucose bovina. Calcula-se que uma área seja enzoótica, e mereceria ficar sob controle oficial, quando anualmente haja de 1 a 3

casos em cada 1.000 bovinos, o que já parece ocorrer em várias regiões de intensa pecuária no Brasil.

Este estudo demonstra que as provas imunológicas de AGID e ELISA, desenvolvidas com os reagentes produzidos neste trabalho, poderiam ser utilizadas como testes de triagem em um programa de controle da LEB, salientando-se que os resultados negativos em animais provenientes de rebanhos infectados deveriam ser confirmados ou não pela PCR-TR.

Outros autores também corroboram a idéia de se utilizar a PCR como método diagnóstico complementar (NAIF et al.,1990; BALLAGI-PORDÁNY et al., 1992; AGRETI et al.,1993; CAMARGOS et al., 2003).

Conforme descrito por FECHNER et al. (1996), há divergências entre os pesquisadores sobre o uso das técnicas de diagnóstico para o controle da LEB. Alguns deles acreditam ser possível estabelecer rebanhos livres do VLB pela identificação e eliminação de animais soropositivos, enquanto outros consideram que o monitoramento sorológico, seja pela AGID ou pelo teste ELISA, não é sensível o bastante para identificar todos os animais infectados pelo VLB.

EAVES et al. (1994) demonstraram que alguns animais naturalmente infectados portadores do DNA proviral do VLB não desenvolveram títulos de anticorpos detectáveis pela AGID e pelo teste ELISA meses e até anos após a infecção.

Em função dos resultados obtidos por FECHNER et al. (1996), estes autores concluíram ser impossível prevenir a difusão da infecção de um país a outro apenas por meio dos testes sorológicos.

Como no Brasil a prevalência da infecção pelo VLB é elevada em várias regiões, sugere-se o emprego das provas sorológicas, de preferência o teste ELISA que é mais sensível, em combinação com a PCR como método confirmatório.

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O passo inicial para o controle da LEB no Brasil foi dado com o desenvolvimento, a padronização, o registro e a produção em maior escala dos reagentes para o diagnóstico da infecção pelo VLB por meio da técnica de AGID.

A implantação de um laboratório para a produção de antígenos virais na Divisão de Antígenos do TECPAR, financiado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) por meio do projeto para a realização deste estudo, veio solidificar os esforços despendidos durante vários anos no sentido de se concretizar a produção de tais insumos.

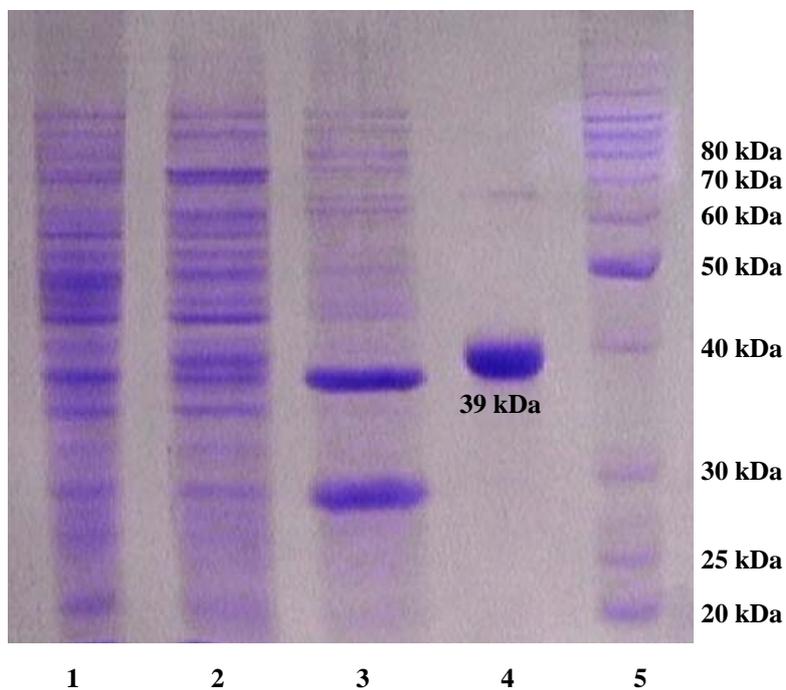
Além dos reagentes desenvolvidos e testados neste trabalho, iniciou-se o processo de obtenção de antígenos recombinantes para o diagnóstico da infecção pelo VLB. Confirma-se assim a tendência observada no segmento de elaboração de imunobiológicos, que busca a substituição dos métodos tradicionais por técnicas de manipulação de ácidos nucleicos para a produção e purificação de biomoléculas.

Estes recentes avanços têm permitido um alto nível de expressão associado a procedimentos de purificação mais eficazes, minimizando dessa forma, os custos de produção e possibilitando a obtenção de reagentes com elevado grau de pureza e que sofrem menor interferência em diferentes lotes de produção.

Ao mesmo tempo, os produtos obtidos por meio de técnicas de engenharia genética são definidos a nível molecular, o que oferece meios mais determinados para o desenho do controle de qualidade, tornando-o mais eficiente.

As figuras a seguir mostram a gp60 do envelope do VLB (gp51 de superfície acrescida de parte da gp30 transmembrana) obtida em sistemas de expressão bacteriano (cepa M15 da *Escherichia coli*) na figura 17 e em células de inseto provenientes de *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) na figura 18.

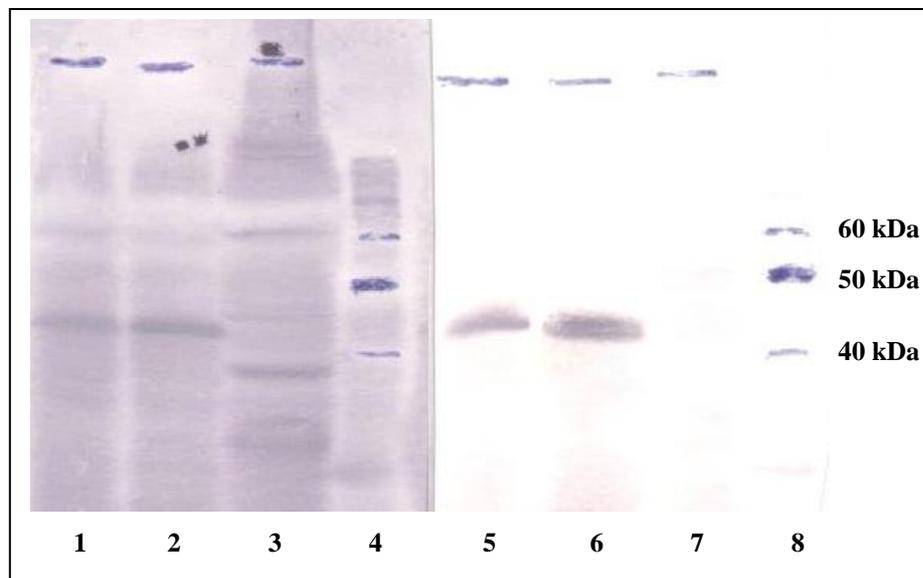
FIGURA 17 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EVIDENCIANDO A gp60 do VLB OBTIDA EM SISTEMA DE EXPRESSÃO BACTERIANO



Legenda

- 1 Lisado de células bacterianas que não sofreram indução
- 2 Lisado de células bacterianas que sofreram indução
- 3 Pré-purificação (corpúsculos de inclusão purificados)
- 4 Proteína recombinante purificada
- 5 Marcador de peso molecular: “BenchMark Protein Ladders”

FIGURA 18 - ANÁLISE POR “WESTERN BLOTTING” DA gp60 RECOMBINANTE EXPRESSA EM CÉLULAS DE INSETO Sf-9



Legenda

- 1 Lisado de células Sf-9 transfectadas (clone 3) com soro de vaca leucótica (1:400)
- 2 Lisado de células Sf-9 transfectadas (clone 5) com soro de vaca leucótica (1:400)
- 3 Lisado de células Sf-9 não transfectadas com soro de vaca leucótica (1:400)
- 4 e 8 Marcador de peso molecular: “BenchMark Protein Ladders”
- 5 Lisado de células Sf-9 transfectadas (clone 3) com soro anti-histidina (1:3000)
- 6 Lisado de células Sf-9 transfectadas (clone 5) com soro anti-histidina (1:3000)
- 7 Lisado de células Sf-9 não transfectadas com soro anti-histidina (1:3000)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. M. G. et al. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. **Arq. EMV-UFBA** Salvador, v. 17, n. 1, 1994.

AGRESTI A. et al. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 3, March 1993.

ALENCAR FILHO, R. A. Imunodifusão como recurso diagnóstico da leucemia linfática crônica em bovinos. **O Biológico**, v. 44, p. 27-8, 1978.

ALENCAR FILHO, R. A. et al. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (LLC) dos bovinos no Estado de São Paulo. **O Biológico**, v. 45, p. 47-54, 1979.

ANDRADE, J. R. A.; ALMEIDA, M. M. R. Prevalência de leucose enzoótica bovina na bacia leiteira de Goiânia, Goiás. **Hora Veterinária**, n. 60, p. 49-53, 1991.

BALLAGI-PORDÁNY A. et al. Direct detection of bovine virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. **J. vet. Med.**, B 39, p.69-77, 1992.

BARROS, C. S. L.; LEMOS, R. A. A. Leucose Viral Bovina. Separata de: LEMOS, R. A. A. **Principais enfermidades de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul: Reconhecimento e Diagnóstico**. Campo Grande: Univ. Fed. de MS, p. 366-385, 1998.

BEER J. **Doenças infecciosas em animais domésticos**. 2^a ed. São Paulo: Roca, 1988, 457p.

BIRGEL, E. H. et al. Considerações sobre a leucose enzoótica dos bovinos adultos em rebanho leiteiro criados no Estado de São Paulo. I Prevalência de soros reagentes. In: SEMANA DA VETERINÁRIA DA FMVZ/USP, 2. São Paulo, 1983. **Anais...**

_____ et al. Ocorrência de infecção causada pelo vírus da leucose bovina em gado leiteiro no Estado de São Paulo. Avaliação pela detecção de anticorpos séricos por imunodifusão com antígeno viral. In: XLIII CONFERÊNCIA

ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, Campinas-Brasil. Proceedings, p. 31, 1988.

_____ et al. Ocorrência da infecção causada pelo vírus da leucose bovina no Estado de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 67-73, 1991.

_____ et al. Prevalência da leucose enzoótica dos bovinos em zebuínos da raça Nelore, criados no Estado de São Paulo. **Arqu. EMV-UFBA**, Salvador, v. 17, n. 1, 1994.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, 15 (4): 93-99, out/dez., 1995.

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Dinâmica das proteínas séricas de fêmeas bovinas da raça holandesa naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos. **Ciência rural** Santa Maria, v.31, n.4, p.615-619, 2001.

BURRIDGE M. J. et al. Fall in antibody titer to bovine leukemia virus in the periparturient period. **Can. J. comp. Med** n. 46, p. 270-271, July, 1982.

CAMARGOS, M. F. et al. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. **Braz J Ver Res Anim** v. 40, n. 5, p. 341-348, 2003.

CAMARGOS, M. F.; REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. Bovine Leukemia Virus. **Virus: Reviews and Research**. Journal of the Brazilian Society for Virology, v. 9, n. 1, p. 44-59, 2004.

CARNEIRO, P. A. M. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica Manaus**, v. 33, n. 1, p. 111-125, 2003.

CARVALHO, L. et al. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Holandesa Preto e Branco e zebuínos da raça Nelore, criados no pólo regional de Londrina, Estado do Paraná. **Semina: Ci. Agr.**, Londrina, v. 17, p. 53-57, mar/1996.

CHANCE, B.; MAEHLI, A. C. Assay of catalases and peroxidases. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1955, v. 2, p. 764-775.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS. Decisão n. 2003/467/CE de 23 de junho de 2003. Estabelece o estatuto de oficialmente indenes de tuberculose, brucelose e leucose bovina enzoótica a determinados Estados-Membros e regiões dos Estados-Membros, no respeitante aos efectivos de bovinos. Relator: David Byrne. Jornal Oficial da União Européia, Bruxelas, 23 jun. 2003. Série L, p. 74-78.

CORRÊA, W. M. e CORRÊA, C. N. . **LEUCOSES**. In: _____ **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro: Editora médica e científica Ltda, 1992, p.699-708.

COULSTON, J. et al. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. **J. Gen. Virol.**, 71 (Pt 8), p. 1737-46, 1990.

CUNHA, R. G.; TEIXEIRA, A. C.; SOUZA, D. M. Antigens of Bovine Leukosis Virus and Precipitating Antibodies in Sera of Cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n.9, p. 1363-1370, 1982.

DINIZ, J. M. F. et al. Leucose Bovina no Estado do Paraná. **Revista do Setor de Ciências Agrárias**, v. 2, p.33-38, jan./jun. 1980.

DITTRICH, T. R. C.; OLIVEIRA, K. B. Detecção de anticorpos para o vírus da leucose bovina (VLB) no rebanho bovino da Fazenda Gralha Azul (FGA). In: III Mostra de Pesquisa da PUCPR, 2000 Curitiba. **Anais...Curitiba: PUCPR Ed. Universitária Champagnat**, 2000. p. 16.

DUBE, S. et al. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. **Virology**, 277 (2), p. 379-86, 2000.

EAVES F.W. et al. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 39, p. 313-321, 1994.

FECHNER H. et al. Direct use of cell lysates in PCR-based diagnosis of bovine leukemia virus infection. **Berl. Münch. Tierärztl., Wschr.** v. 109, p. 446-450, 1996 a.

FECHNER H. et al. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. **J. Vet. Med.**, B 43, p. 621-630, 1996 b.

FENNER, F. J. et al. **Veterinary Virology**. 2 ed. San Diego, California: Academic Press Inc., 1993, 666p.

FERREIRA, A. J. Doenças Infecto-contagiosas dos Animais Domésticos, 2^a Edição, Lisboa: Fundação Calauste Guebenkian, 1968.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed Rio de Janeiro: ed. Guanabara koogan, 2001, 442p.

FERREIRA, M. I. C.; ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Contagem linfocitária e anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em rebanhos do Rio de Janeiro. **Pesq.Vet.Bras.** v. 2, p. 99-104, 1981.

FERRER, J. F. Bovine lymphosarcoma. **Adv.Vet.Sci.Comp.Med.** v. 24, p. 1-68, 1980.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fundamental Virology** 3a.ed. Philadelphia Lippincott-Raven, 1996, 1340 p.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiologia clínica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989. cap. 3, p. 68-107.

FLORES, E. F. et al. Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) no rebanho leiteiro de Santa Maria, RS. **Rev. Cent. Ciênc. Rur.** ,Santa Maria, v. 18, p. 67-73, 1998.

_____ WEIBLEN, R.; REBELATTO, M. C. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **Hora Veterinária**, 58, 25-29, 1990.

GARCIA M. et.al. Avaliação do leucograma de fêmeas da raça holandesa naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina. **Pesq. Vet. Bras.** v. 11, n. 3/4, p. 61-64, jul/dez 1991.

GARCIA, M. et al. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, n. 88, p. 41-44, 1995.

GOMES, M. et al. Detecção de anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em bovinos no Estado do R. S. **Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. R.G. Sul**, v. 13, p. 15-22, 1985.

JACOBS, R. M. et al. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. **C. J. Vet. Res.**, v. 56, p. 339-348, 1992.

JACOBSON, R. H.; DOWNING, D. R.; LYNCH, T. J. Computer-assisted enzyme immunoassays and simplified immunofluorescence assays: Applications for the diagnostic laboratory and the veterinarian's office. **JAVMA**, v. 181, n. 10, p. 1166-1168, 1982.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1a. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, 417 p.

JAIN, N. C. Hematologic Techniques In: **Schalm's Veterinary Hematology**, 4 ed., Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, p. 20-86.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-314, 1992.

KANTEK, C. E.; KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Infecção com o vírus da leucose enzoótica bovina em um lote de vacas produtoras de leite importadas do Uruguai. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, p. 125-126, 1982.

_____ KRUGER, E. R.; WELTE, V. R. Prevalência do Vírus da Leucose Enzoótica Bovina no Rebanho Leiteiro do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, p. 124-129, 1983.

KELLY, E. J. et al. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, n. 2, February 1993.

KLINTEVALL, K. et al. Bovine leukaemia: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. **Veterinary Microbiology**, v. 42, p. 191-204, 1994.

LEITE, R. C. et al. Leucose enzoótica bovina em Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, Fortaleza, CE, 1980. **Anais...** p. 207.

LIMA, E. G.; HAYASSAKA, I. M.; PEINADO, M. Inquérito sorológico para leucose bovina em gado importado. **Rev. Patol. Trop.**, v. 9, p. 137-143, 1980.

Manual of standards for diagnostic tests & vaccines, OIE, 4th Ed., 2000. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/a_summry.htm. Acesso em 24 de maio de 2001.

MEGID, J. et al. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 5, Belo Horizonte, out/2003.

MELÉNDEZ, L.V. et al. Manual de diagnostico rapido de enfermedades virales de los animales utilizando metodos inmunoenzimaticos. **IICA Publicacion Científica**, Washington, D.C., n. 15, p. 1-34, 1987.

MELO, L. E. H. **Leucose enzoótica bovina: prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do estado de Pernambuco.** São Paulo, 1991, 102 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MODENA, C. M. et al. Ocorrência de infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina em animais importados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 35, p. 365-373, 1983.

_____ et al. Prevalence of Enzootic Bovine Leukosis in the State of Minas Gerais - Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 36, p. 39-46, 1984.

_____ et al. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos Estados de Rondônia e Acre. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 42, p. 203-210, 1990.

MOLNÁR, E. et al. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 19, n. 1, Rio de Janeiro, Jan/1999.

MORAES, M. P. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, RS**, v. 26, n. 2, p. 257-262, maio/ago, 1996.

MURTAUGH, M. P. et al. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 73-85, 1991.

NAIF H. M. et al. Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 25, p. 117-129, 1990.

OLIVEIRA A. R., et al. Leucose bovina: caracterização do proteinograma eletroforético em dois rebanhos identificados como soropositivos e com linfocitose persistente. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 67, n. 1, jan/jun 2000.

OLLHOFF, R. D. et al. Leucose enzoótica bovina como causa de ulcerações múltiplas em abomaso: relato de um caso. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA (11/2003: Salvador). **Resumos...** p.25.

PETROPOULOS, C. J. Retroviral taxonomy, protein structure, sequences, and genetic maps. In: COFFIN, J.M. (Ed.) **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

RADOSTITS, O. M. et al. Doenças causadas por vírus e chlamydia - I. In: _____ **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, cap. 21, p. 916-1018.

REINHARDT, G. et al. Estudio serologico de leucosis enzootica bovina en un predio de la provincia de Valdivia y su relacion a parametros productivos y reproductivos. **J.Vet.Med., B**, v. 35, p. 178-185, 1988.

RICE, N. R. et al. The gag and pol genes of bovine leukemia virus: nucleotide sequence and analysis. **Virology**, 142 (2), p. 357-77, 1985.

ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 13, p. 107-111, 1981.

SAGATA, N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 82 (3), p. 677-681, 1985.

SANTOS, J. L. et al. Epidemiologia da leucose enzoótica bovina no Estado de Minas Gerais. I. Prevalência de anticorpos na Zona da Mata. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 37, p. 359-368, 1985.

SCARCI, R. M. et al. Avaliação dos testes sorológicos e hematológicos no diagnóstico na leucose bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17, Fortaleza, 1980. **Anais...** p. 137.

SHERMAN, M. P. et al. Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 185-191, Jan. 1992.

SILVA, S. V.; BIRGEL, E. H. **Leucose enzoótica dos bovinos: Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em rebanhos cruzados holandês/zebu e em animais da raça pé-duro, criados no Estado do Piauí**. Tese (Doutorado), 176 p., São Paulo, 2001.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**, vol 2, 1^a ed.brasileira, São Paulo: Manole, 1994, 1738 p.

TÁVORA, J. P. F. **Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo de Itabuna, Estado da Bahia**. São Paulo, 1990. 106 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.

THOMPSON, J. D. et al. The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

VAN DER MAATEN, M. J.; MILLER, J. M.; BOOTHE, A. D. Replicating type-C virus particle in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. **J Natl Cancer Inst**, n. 52, p. 491-497, 1974.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bull. World Health Organ.**, v. 53, p. 55-65, 1976.

XIE, B. et al. Detection of proviral DNA of bovine leukaemia virus in cattle by a combination of in-situ hybridization and the polymerase chain reaction. **J. Comp. Path.**, v. 116, p. 87-96, 1997.

ANEXO 1 - SOLUÇÕES E MEIOS UTILIZADOS NO CULTIVO DAS CÉLULAS FLK-BLV

1. PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfatos: Preparou-se o PBS da seguinte maneira: NaCl, 0,137 M (8,0 g); KCl, 0,003 M (0,2 g); Na₂HPO₄, 0,008 M (1,2 g); KH₂PO₄, 0,0015 M (0,2 g); água deionizada até 1000 mL. Ajustou-se o pH em 7,2 a 7,4, esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, estocando-se em temperatura ambiente.

2. Solução de tripsina a 2,5 %: Dissolveu-se 2,5 g de tripsina em pó em 100 mL de PBS por agitação lenta em banho de gelo durante 30 minutos. Esterilizou-se por filtração em membrana de 0,22 µm, distribuindo-se em frascos ou tubos de vidro, os quais foram mantidos a 20 °C negativos.

3. Solução de versene a 10 %: Preparou-se essa solução misturando-se 10 g de EDTA dissódico e água deionizada até completar o volume de 100 mL. Após a dissolução, esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, conservando-se a temperatura ambiente.

4. TVS - Solução de Tripsina e Versene: Essa solução foi preparada a partir das seguintes soluções já esterilizadas: 97,75 mL de PBS, 2,0 mL de solução de tripsina a 2,5 % e 0,25 mL de solução de versene a 10 %, conservando-se metade do volume a 4 °C para utilização imediata e congelando-se o restante a 20 °C negativos.

5. Solução de bicarbonato de sódio a 7,5 %: Pesou-se 7,5 g de bicarbonato de sódio e dissolveu-se em 100 mL de água deionizada. A solução foi autoclavada a 121 °C durante 15 minutos e conservada em temperatura ambiente.

6. PEN - Solução de Penicilina G Potássica: Suspendeu-se o conteúdo de um frasco contendo 5.000.000 UI (unidades internacionais) de benzilpenicilina

potássica em 20 mL de água deionizada estéril. Após completa dissolução e homogeneização, alíquotas de 4 mL foram dispensadas em frascos de vidro esterilizados, que foram mantidos congelados a 20 °C negativos. Utilizou-se 0,2 mL dessa solução-estoque contendo 250.000 UI/mL para cada 100 mL de meio de cultivo celular, totalizando 500 UI de penicilina G potássica por mL de meio.

7. NEO - Solução de Sulfato de Neomicina: Misturou-se 1 g de sulfato de neomicina em 40 mL de água deionizada estéril, distribuindo-se 4 mL dessa solução estoque com 25 mg/mL de concentração em pequenos frascos de vidro esterilizados, os quais foram congelados a 20 °C negativos. Sendo a concentração de uso de neomicina 50 µg por mL de meio, utilizou-se 0,2 mL da solução-estoque para cada 100 mL de meio de cultivo celular.

8. FUN - Solução de Anfotericina B: Utilizou-se para preparar essa solução o produto comercial “Fungizon” da marca Squibb, apresentado em frascos com 50 mg de anfotericina B, quantidade essa dissolvida em 40 mL de água deionizada estéril. Distribuiu-se em frascos de vidro esterilizados, alíquotas de 4 mL dessa solução com concentração de 1,25 mg/ mL. Esses frascos foram congelados em “freezer” a 20 °C negativos. Utilizou-se 0,1 mL da solução-estoque para cada 100 mL de meio de cultivo, ou seja, 1,25 µg de anfotericina B por mL de meio.

9. ME - Meio Estoque: O meio estoque para o cultivo celular foi preparado misturando-se o conteúdo liofilizado de um frasco da mistura nutriente Ham F10 e de um frasco do meio de cultura 199 com sais de Hanks e L-glutamina, ambos da marca Sigma, em 2 litros de água deionizada. Após sua completa dissolução, esterilizou-se por filtração em membranas de 0,45 µm e 0,22 µm, distribuindo-se diretamente em frascos de vidro esterilizados, os quais foram mantidos a 4 °C.

10. MC - Meio de Crescimento: Para preparar o MC, acrescentou-se ao ME as soluções PEN, NEO e FUN nas concentrações acima descritas e soro fetal bovino (SFB) estéril, comercial, na proporção de 5 %. Ajustou-se em 7,2 a 7,4 o pH do

meio, utilizando-se a solução de bicarbonato de sódio a 7,5 %. Conservou-se o MC a 4 °C.

11. MCC - Meio de Congelamento Celular: Para congelamento das células, preparou-se uma solução contendo 10 % de DMSO em SFB.

ANEXO 2 - CONGELAMENTO E ESTOCAGEM DAS CÉLULAS FLK-BLV

Após a completa formação da monocamada de células, foram seguidas as etapas abaixo relacionadas para o congelamento e estocagem das mesmas:

1. Descarte do MC.
2. Lavagem da monocamada celular com PBS.
3. Descolamento das células pelo tratamento com TVS.
4. Neutralização da TVS com MC e suspensão das células.
5. Centrifugação em centrífuga clínica da marca MediSpin[®] IEC, a 1.228 g (3.100 rpm) durante 5 minutos, para a formação do sedimento celular.
6. Descarte do meio sobrenadante para a retirada da TVS.
7. Com o sedimento celular em banho de gelo, suspensão do mesmo com MCC gelado.
8. Distribuição da suspensão celular gelada em criotubos mantidos em banho de gelo, sendo 1mL em cada criotubo. Para cada garrafa com 25 cm² de superfície prepararam-se 2 criotubos. Com as garrafas de 75 cm² de superfície podem ser preparados 6 criotubos e com as de 150 cm² de superfície, 12 criotubos.
9. Manutenção dos criotubos a 4 °C durante 30 minutos e em “freezer” a 20 °C negativos por 2 horas, para perda de cerca de 1 °C por minuto. O processo de congelamento deve ser realizado lentamente.
10. Proteção dos criotubos com algodão, gaze e isopor e manutenção dos mesmos em “freezer” a 70 °C negativos por 12 horas.
11. Transferência dos criotubos para o botijão com nitrogênio líquido.

ANEXO 3 - MEIOS UTILIZADOS NA OBTENÇÃO DA MATÉRIA PRIMA

1. MM - Meio de Manutenção: O MM foi preparado de forma idêntica ao MC, com exceção do SFB, que foi acrescentado na proporção de 1 %, ao invés de 5 %. Igualmente ao MC, manteve-se o MM a 4 °C.

2. TIO - Meio de Tioglicolato: Reconstituiu-se 5,9 g do referido meio em pó em 200 mL de água deionizada moderadamente aquecida. Após a dissolução, dispensaram-se 18 mL do meio líquido em cada tubo de 18 mm x 200 mm. Os tubos foram tampados com bucha de algodão e gaze, esterilizados a 121 °C durante 15 minutos em autoclave e estocados em temperatura ambiente por não mais que 1 mês. No momento do uso, os tubos contendo o meio reconstituído estocado foram previamente colocados em banho de água fervente durante 15 minutos, esfriados naturalmente sem agitação e só então semeados, permitindo, com isso, a remoção do oxigênio dissolvido e possibilitando o crescimento de bactérias anaeróbias, caso estivessem presentes no material analisado.

3. CAS - Caldo de Soja Trypticaseína: Dissolveu-se 6 g desse meio em pó em 200 mL de água deionizada, aquecendo-se ligeiramente a solução para completa dissolução. Distribuiu-se o caldo em tubos de ensaio de 18 mm x 200 mm, 18 mL em cada tubo, os quais foram tampados com bucha de algodão e gaze. Esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, estocando-se em temperatura ambiente por um período máximo de 1 mês.

ANEXO 4 - PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO POR ULTRAFILTRAÇÃO COM A UTILIZAÇÃO DO CENTRIPREP - 30 (SISTEMA AMICON)

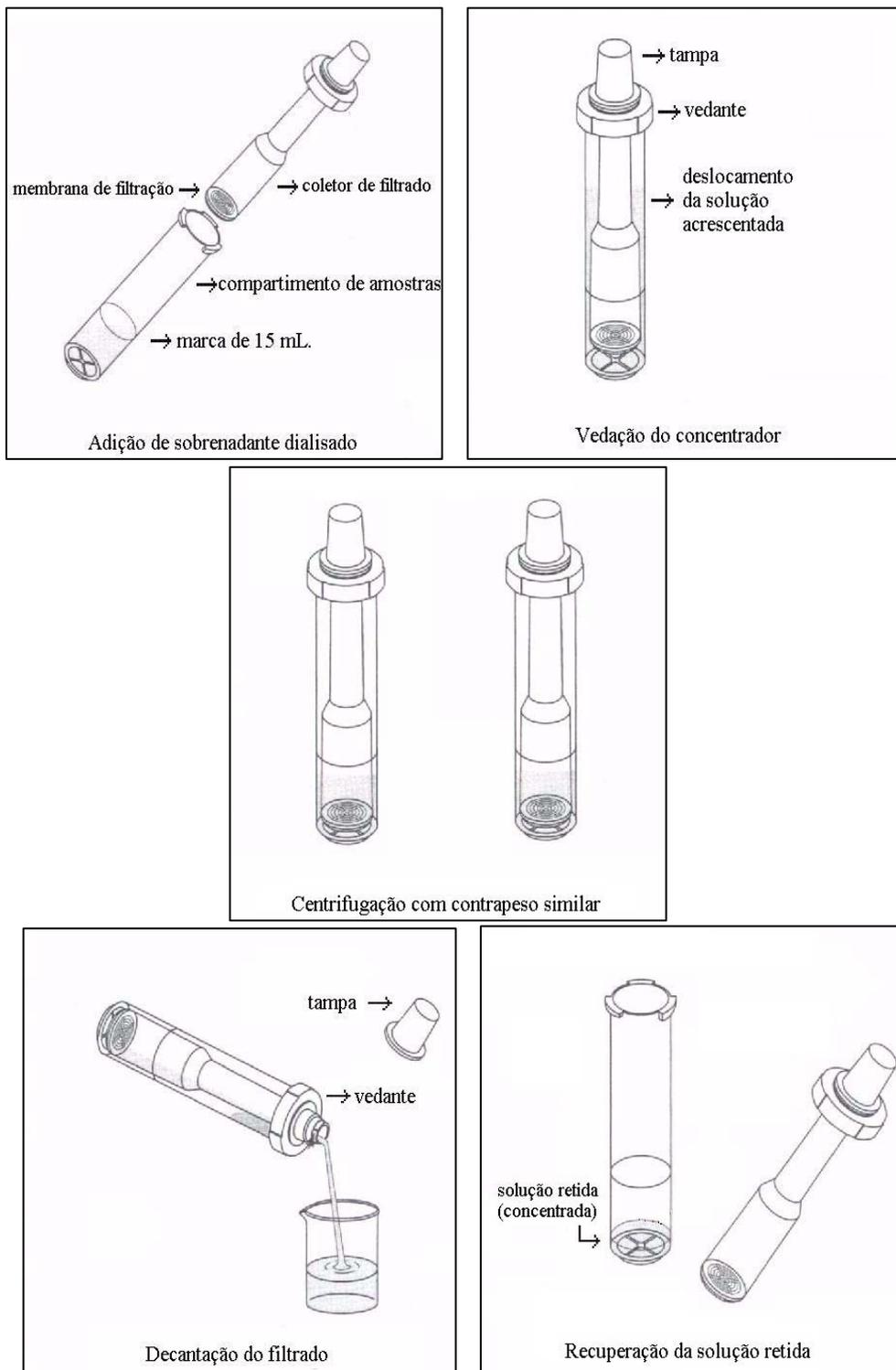
Para a concentração final do antígeno, processou-se as etapas enumeradas a seguir:

1. Adicionou-se um volume de 15 mL da solução a ser concentrada, no caso o sobrenadante dialisado, ao compartimento de amostras do Centriprep - 30.
2. Inseriu-se o coletor de filtrado sobre o compartimento de amostras até deslocar a solução acrescentada, banhando a membrana de filtração do Centriprep - 30 e, ao mesmo tempo, vedando o concentrador.
3. Centrifugou-se a uma velocidade de 1500 g a 4 °C, com contrapeso similar, durante um período de 15 minutos.
4. Decantou-se o filtrado e recuperou-se a solução retida, medindo o seu volume para verificar o grau de concentração.

Observação: o material necessita ser concentrado dez vezes nessa fase, ou seja, iniciando-se com 15 mL do sobrenadante dialisado, deve-se obter um volume final de 1,5 mL da solução retida. Caso esse volume seja maior, repete-se o processo de centrifugação por um período de tempo menor.

A figura 19, apresentada a seguir, esquematiza o processo de concentração por ultrafiltração para a obtenção do antígeno.

FIGURA 19 - UTILIZAÇÃO DO CENTRIPREP-30 PARA A CONCENTRAÇÃO DO ANTÍGENO



ANEXO 5 - TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NA PURIFICAÇÃO DO VLB

1. Tampão TNE estoque 10 vezes concentrado (10 X): Preparou-se esse tampão da seguinte maneira: Tris base, 100mM; EDTA, 10mM; NaCl, 2M. Ajustou-se o pH para 7,4 com ácido clorídrico concentrado, estocando-se a 4 °C.

2. Tampão TNE uso: No momento do uso, diluiu-se 1 parte de tampão TNE estoque em 9 partes de água ultrapura. Ajustou-se o pH para 8,0 e filtrou-se em membrana de 0,22 µm.

3. Tampão Tris-HCl 1M pH 7,5: Pesou-se 121,1 g de Tris base (P.M. 121,1) e dissolveu-se em 800 mL de água ultrapura. Ajustou-se o pH para 7,5 com 60 mL de ácido clorídrico concentrado. O tampão foi resfriado até 25 °C e o pH reajustado. Completou-se o volume com água ultrapura até 1.000 mL. Filtrou-se em membrana de 0,45 µm, conservando-se a 4 °C.

4. Tampão STE: O tampão STE foi preparado com 10 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5, 10mM de NaCl e 1 mM de EDTA. Ajustou-se o pH para 8,0 e esterilizou-se em autoclave a 121 °C durante 15 minutos, conservando-se a 4 °C.

5. Solução de sacarose a 60 %: Preparou-se essa solução misturando-se 30 g de sacarose e tampão TNE uso pH 8,0 até completar o volume de 50 mL. Após a dissolução a 37 °C, filtrou-se em membrana de 0,45 µm, mantendo-se a 4 °C.

6. Solução de sacarose a 30 %: Foi preparada de forma idêntica à solução de sacarose a 60 %, utilizando-se 15 g de sacarose ao invés de 30 g.

ANEXO 6 - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA SEPARAÇÃO DOS LINFÓCITOS

1. Solução A: Preparou-se essa solução da seguinte maneira: D-glicose anidra, 0,1 % (1,0 g); $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 mM (0,0074 g); $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,98 mM (0,1992 g); KCl, 5,4 mM (0,4026 g); TRIS 145 mM (17,565 g). Dissolveu-se em aproximadamente 950 mL de água deionizada. Agitou-se a solução em agitador magnético e adicionou-se HCl 10N (HCl concentrado) até o pH atingir 7,6. Completou-se o volume com água deionizada até 1000 mL. Conservou-se a 4 °C.

2. Solução B: Dissolveu-se 8,19 g de NaCl (140mM) em 1000 mL de água deionizada, mantendo-se a temperatura ambiente.

3. Solução salina balanceada: Essa solução foi preparada misturando-se 1 volume da solução A com 9 volumes da solução B, sendo válida por uma semana, quando conservada a 4 °C.

ANEXO 7 - SOLUÇÃO UTILIZADA NA DESCONTAMINAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Solução de hipoclorito de sódio a 5 %: Diluiu-se 150 mL de hipoclorito de sódio P.A. em água deionizada, completando-se o volume até 3000 mL, tendo sido preparada a cada utilização.

ANEXO 8 - CONTEÚDO DOS TAMPÕES E DA COLUNA UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO DO DNA LINFOCITÁRIO

1. Tampão de extração: Isotiocianato de guanidina, 4 M; Tris-HCl, 100 mM, pH 7,5.

2. Tampão de aplicação: Tris-HCl, 500 mM, pH 7,0; RNase A, 200 µg/mL.

3. Tampão de lavagem: KCl, 750 mM; Tris-HCl, 100 mM, pH 7,5; Isotiocianato de guanidina, 100m M.

4. Tampão de eluição: KCl, 1,5 M; Tris-HCl, 100 mM, pH 9,0.

5. Coluna MicroSpin™: É uma coluna de troca iônica, contendo 0,15 % Kathon CG/IPC Biocide.

ANEXO 9 - SOLUÇÃO, TAMPÃO E GEL DE AGAR UTILIZADOS NA PROVA DE AGID

1. NaOH 1N - Solução a 1 Normal de Hidróxido de Sódio: Em recipiente plástico, pesou-se 2,0 g de hidróxido de sódio, completando-se com água deionizada até o volume de 50 mL. Transferiu-se para um frasco plástico, o qual foi mantido a temperatura ambiente.

2. Tampão para imunodifusão: Preparou-se esse tampão misturando-se 42,5 g de NaCl, 0,1 g de KCl, 0,6 g de Na_2HPO_4 , 0,1 g de KH_2PO_4 , 0,186 g de EDTA dissódico, 0,05 g de azida sódica e água deionizada até completar o volume de 500 mL. Agitou-se a solução em agitador magnético até a completa dissolução e, em seguida, ajustou-se o pH para 7,3 com solução a 1N de NaOH. O tampão foi conservado a 4 °C.

3. Gel de agar a 0,9 %: Dissolveu-se 0,9 g de Agar Noble (marca Difco) em 100 mL do tampão para imunodifusão, descrito acima. Pesou-se em conjunto o frasco e o seu conteúdo. Para a completa dissolução do agar, colocou-se o frasco em banho de água fervente, agitando-se manualmente o mesmo em pequenos intervalos de tempo. Após o desaparecimento completo de grânulos ou flocos de agar, o frasco foi novamente pesado. Completou-se com água deionizada até se atingir o peso inicial, objetivando-se repor o líquido perdido através da evaporação, a fim de se manter a concentração de agar requerida. O gel de agar, ainda quente, foi distribuído em placas de Petri de vidro com 50 mm de diâmetro, 5 mL em cada uma delas. Manteve-se as placas destampadas a temperatura ambiente por cerca de 1 hora em local livre de pó, permitindo a evaporação da umidade excedente e o resfriamento do agar. As placas foram conservadas com as tampas para baixo, dentro de uma câmara úmida a 4° C, até sua utilização, por um período máximo de 30 dias.

ANEXO 10 - MÉTODO DE BRADFORD PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A fim de se determinar a concentração protéica do antígeno desenvolvido para o teste ELISA, utilizou-se o método de Bradford, seguindo-se as etapas abaixo:

1. Diluiu-se soroalbumina bovina em água ultrapura, obtendo-se soluções de 6 diferentes concentrações dessa proteína (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL e 0,5 mg/mL) com a finalidade de se construir uma curva controle.
2. Também em água ultrapura, foram feitas diluições duplas (1:2, 1:4 e 1:8) do antígeno elaborado para o teste ELISA.
3. Preparou-se, imediatamente antes do uso, o reagente de trabalho, diluindo-se 1 volume do reagente de Bradford (“Dye Reagent Concentrate”, Bio-Rad), conservado a 4 °C, em 4 volumes de água ultrapura.
4. Em orifícios de tiras individuais de poliestireno da marca Nunc (as mesmas utilizadas no teste ELISA) adicionou-se com micropipeta, em duplicata, um volume de 10 µL de cada solução de soroalbumina, bem como de cada diluição do antígeno, do antígeno puro e de água ultrapura (branco para zerar o espectrofotômetro).
Observação: As tiras foram encaixadas em suporte apropriado, formando uma placa única.
5. Sobre cada material pipetado nos orifícios das tiras, acrescentou-se 200 µL do reagente de trabalho.
6. Agitou-se a placa manualmente para homogeneização do conteúdo.
7. Ligou-se o espectrofotômetro multicanal da marca Bio-Tek® e, após 20 minutos, procedeu-se a leitura das absorbâncias em comprimento de onda de 600 nanômetros.

8. Calculou-se a concentração protéica do antígeno, multiplicando-se o valor da absorbância pelo fator de diluição, obtendo-se o resultado em mg/mL. No caso do antígeno puro, o valor da absorbância foi considerado a concentração de proteína.
9. Para minimizar os erros inerentes à técnica, procedeu-se a média entre as duplicatas e entre os resultados obtidos nas diferentes diluições, calculando-se a concentração final de proteína no antígeno.

ANEXO 11 - TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NO TESTE ELISA

1. Tampão de sensibilização: Preparou-se esse tampão da seguinte maneira: carbonato de sódio Na_2CO_3 0,016 M (2,03 g); bicarbonato de sódio NaHCO_3 0,034 M (3,43 g); água ultrapura até completar 1.200 mL. Agitou-se a solução em agitador magnético até a completa dissolução e em seguida ajustou-se o pH para 9,6. O tampão foi conservado a 4 °C.

2. Tampão de bloqueio: Esse tampão foi preparado misturando-se 1 mL do detergente Tween 20 a 99 mL de PBS (anexo I). A fim de se dissolver uniformemente o detergente no PBS, agitou-se o tampão manualmente, tendo o mesmo sido preparado em quantidade suficiente para o número de placas de ELISA processadas no dia.

3. Tampão de lavagem: Da mesma forma que o tampão de bloqueio, o tampão de lavagem foi preparado em quantidade suficiente para uso imediato, no mesmo dia do teste, diluindo-se o detergente Tween 20 em PBS na concentração de 0,05 %.

4. Solução de cromógeno: Dissolveu-se 0,1 g de TMB (tetrametilbenzidina) em 10 mL de DMSO (dimetilsulfóxido). A solução foi distribuída em alíquotas de 1 mL, as quais foram acondicionadas ao abrigo da luz e mantidas a 4 °C.

5. Solução de substrato: Misturou-se 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (água oxigenada 30 volumes) em 4,5 mL de água ultrapura. A solução foi homogeneizada, tendo sido dispensada em volumes de 1 mL em criotubos, que foram conservados a 4 °C, envoltos em papel alumínio.

6. Tampão cromógeno/substrato: Pesou-se 0,7 g de ácido cítrico (0,025 M) e 1,61 g de fosfato de sódio dibásico $7 \text{ H}_2\text{O}$ (0,05 M), completando-se com água

ultrapura até o volume de 120 mL. Após homogeneização para dissolução, o tampão foi mantido a 4 °C.

7. Solução de revelação: Para preparar essa solução em quantidade suficiente para uma placa de ELISA com 96 orifícios, misturou-se 10 mL de tampão cromógeno/substrato, devendo o mesmo estar a temperatura ambiente, 100 µL de solução de cromógeno e 20 µL de solução de substrato. A solução foi homogeneizada, sendo utilizada imediatamente após o seu preparo.

8. Solução de neutralização: Para parar a reação do teste ELISA, após o tempo padronizado, utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico a 2 M, a qual foi preparada misturando-se 11,1 mL de H₂SO₄ (densidade de 1,84 g/mL e 96% de concentração) a 88,9 mL de água ultrapura.

ANEXO 12 - TAMPÕES E SOLUÇÕES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DAS CÉLULAS FLK-BLV

1. Tampão de lise: Preparou-se esse tampão misturando-se 1 mL de SDS em 99 mL de PBS. Após homogeneização, o tampão foi conservado a 4 °C.

2. Tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5: Para preparar esse tampão, utilizou-se 100 µL do tampão Tris-HCl 1 M pH 7,5 (anexo V) em 9,9 mL de água ultrapura.

3. Solução de proteinase K: Suspendeu-se o conteúdo de um frasco contendo 1 g de proteinase K liofilizada em 10 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Adicionou-se 50 µL de SDS à solução. Após homogeneização, incubou-se em banho maria a 37 °C por 30 minutos (pré digestão). Dispensou-se alíquotas de 100 µL em tubos Eppendorf, que foram conservados em “freezer” a 20 °C negativos.

4. Tampão Tris base 100 mM pH 11: Pesou-se 12,11 g de Tris base (P.M. 121,1) e dissolveu-se em 1.000 mL de água ultrapura. Após homogeneização, o tampão foi filtrado em membrana de 0,45 µm e conservado a 4 °C.

5. NaOH 10 M - Solução a 10 Molar de Hidróxido de Sódio: Em recipiente plástico, pesou-se 20 g de hidróxido de sódio, completando-se com água deionizada até o volume de 50 mL. Transferiu-se para um frasco plástico, o qual foi mantido a temperatura ambiente.

6. Solução de EDTA a 0,5 M: Dissolveu-se 93,06 g do sal dissódico do ácido etileno diamino tetracético Na₂EDTA 2 H₂O (P.M. 372,24) e dissolveu-se em 400 mL de água ultrapura, ajustando-se o pH até 8,0 com aproximadamente 50 mL de uma solução de NaOH a 10 M. Completou-se com água ultrapura até o volume de 500 mL. Filtrou-se em membrana de 0,45 µm, armazenando-se a temperatura ambiente.

7. Tampão Tris/EDTA: Esse tampão foi preparado utilizando-se 1 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 7,5 e 0,2 mL de solução de EDTA a 0,5 M. Completou-se até o volume de 100mL com água ultrapura, ficando o tampão de uso com as seguintes concentrações: 10 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5 e 1 mM de solução de EDTA. Após homogeneização, o tampão foi armazenado a 4 °C.

8. Solução saturada de fenol: O fenol foi fundido em banho maria a 65 °C, tornando-se incolor no estado líquido. Foram distribuídas alíquotas de 25 mL em tubos da marca Falcon com capacidade de 50 mL. Acrescentou-se igual volume (25 mL) de água ultrapura. A solução foi homogeneizada e mantida a 4 °C por um período de 12 horas, após o qual, a fase aquosa superior foi retirada. Acrescentou-se igual volume de tampão Tris base 100 mM pH 11 à fase fenólica. Após agitação vigorosa, aguardou-se até a separação completa das duas fases, quando então, repetiu-se os procedimentos de aspiração da fase superior e de saturação do fenol com Tris base 100 mM pH 11. Retirou-se a maior parte da fase aquosa e mediu-se o pH da fase fenólica com papel indicador. Observação: O processo de saturação deve ser repetido até o pH atingir 7,5. Acrescentar 5 mL de tampão Tris/EDTA para conservação do fenol, que deve ser mantido a 4 °C ao abrigo da luz.

9. Solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico: Misturou-se 25 partes da solução de fenol saturado em 24 partes de clorofórmio, acrescentando-se 1 parte de álcool isoamílico. A solução foi homogeneizada, tendo o frasco sido acondicionado ao abrigo da luz a 4 °C, para utilização após a separação das diferentes fases.

10. Solução de acetato de sódio 3 M pH 7,0: Pesou-se 40,8 g de acetato de sódio 3 H₂O (P.M. 136,08) e dissolveu-se em 80 mL de água ultrapura. A solução foi homogeneizada e o pH ajustado até 7,0 com ácido acético glacial.

Completo-se com água ultrapura até o volume de 100 mL. Filtrou-se em membrana de 0,45 μm , armazenando-se a 4 °C.

11. Solução de etanol a 70 %: Preparou-se essa solução misturando-se 70 mL de etanol absoluto de boa qualidade em 30 mL de água ultrapura. Após homogeneização, manteve-se a solução a -20 °C.

12. Solução de RNase A, livre de DNase: Dissolveu-se RNase A até a concentração de 10 mg/mL com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 e NaCl 15 mM. Ferveu-se a solução durante 15 minutos, permitindo-se que a mesma esfriasse vagarosamente. Distribuiu-se alíquotas de 100 μL em tubos Eppendorf, os quais foram armazenados a -20 °C.

ANEXO 13 - COLORAÇÃO DE WRIGHT

1. Cobrir o esfregaço sangüíneo com o corante,
2. Deixar agir por 5 minutos,
3. Acrescentar água destilada até misturar com o corante,
4. Deixar agir por 10 minutos,
5. Lavar em água corrente,
6. Secar a temperatura ambiente,
7. Examinar ao microscópio em objetiva de imersão (aumento de 1.000 vezes).

ANEXO 14 - SOLUÇÕES PARA CONTAGEM DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS

1. Solução para a contagem de eritrócitos: uma solução salina fisiológica foi preparada misturando-se 0,85 g de NaCl em água deionizada e completando-se o volume até 100 mL, tendo sido mantida a temperatura ambiente.

2. Solução para a contagem de leucócitos: diluiu-se 4 mL de ácido acético glacial em água deionizada até completar o volume de 100 mL. A solução foi conservada a temperatura ambiente.

Ninguém pode tirar de você...

- a graça de ser amado por Deus.
- a fé no amor, mesmo em tempos de guerra.
- a força para transformar a vida.
- a perseverança para realizar seus sonhos.
- a liberdade de dizer "não".
- a humildade de reconhecer seus erros.
- a vitória de ter resistido a uma tentação.
- a coragem de ser simplesmente você.
- a honestidade de assumir suas limitações.
- a disposição de tentar mais uma vez.
- a vontade de enfrentar desafios.
- a capacidade de pedir ajuda.
- a sensação do dever cumprido.
- a esperança de um futuro melhor.
- a alegria de se doar.
- o desejo de crescer.
- o direito de ser feliz.
- a certeza de que a vida sempre vale a pena!