

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB): resultados preliminares¹

Caroline Tochetto²; Adriana Carla Balbinot³; Talita Carina Bogoni⁴; Diogenes Dezen⁵

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade viral crônica de ocorrência mundial em rebanhos bovinos. A doença é causada pelo vírus da leucose bovina (VLB), um Deltaretrovírus exógeno que infecta preferencialmente linfócitos B (GOFF, 2007). A maioria dos animais acometidos permanece persistentemente infectado, 30% desenvolvem linfocitose persistente e menos de 5% dos animais desenvolvem linfossarcoma (RADOSTITS et al, 2010). No Brasil, animais infectados já foram detectados em rebanhos leiteiros de diversos estados brasileiros, (CAMARGOS et al., 2002; FERNANDES, 2007; MATOS et al., 2005; MEGID et al., 2003; POLETTO et al., 2004; ROMERO e ROWE, 1981), sendo a prevalência de animais infectados variável de 8,3% a 54,3%.

Na maioria dos casos a doença é assintomática levando à falta de conhecimento entre produtores e técnicos sobre sua real importância (RAJÃO, 2008). Em rebanhos leiteiros, estima-se que o custo anual ocasionado pela LEB seja de aproximadamente US\$ 57/vaca (OTT et al. 2003). A infecção pelo VLB acarreta custos diretos, resultantes da morte ou descarte de animais, condenação de carcaças em matadouros, queda na produção e gastos com serviço veterinário (PELZER, 1997; THURMOND et al., 1985). Segundo Rajão (2008), animais infectados pelo VLB reduziram a produção de leite por lactação em 10,1%, levando a um prejuízo de R\$ 332,95 por lactação de cada animal infectado. Como custos

¹Bolsista CNPq/PIBIC (Edital 81/2012)

²Acadêmica do Instituto Federal Catarinense - Câmpus Concórdia. Curso de Medicina Veterinária. E-mail: carolinetochetto@hotmail.com

³Acadêmica do Instituto Federal Catarinense - campus Concórdia. Curso de Medicina Veterinária. E-mail: adry_balbinot@hotmail.com

³Acadêmica do Instituto Federal Catarinense - Câmpus Concórdia. Curso de Medicina Veterinária. E-mail: tbogoni@gmail.com

⁵Professor Orientador do Instituto Federal Catarinense - Câmpus Concórdia. Curso de Medicina Veterinária. E-mail: diogenes.dezen@ifc-concordia.edu.br

indiretos podem-se destacar as barreiras à exportação de animais e produtos de origem animal (RADOSTITS et al, 2010).

Medidas de controle e prevenção podem reduzir significativamente os níveis de infecção, e conseqüentemente diminuir os prejuízos econômicos ocasionados por este patógeno. Porém, para que o controle da LEB tenha sucesso é necessário determinar sua prevalência no rebanho e realizar monitorias sorológicas periódicas (JOHNSON e KANEENE, 1991). A Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) é um método amplamente utilizado na detecção de anticorpos contra VLB, sendo uma técnica de fácil realização e baixo custo (CAMARGOS, 2005). Todavia a técnica de IDGA é relativamente demorada (72 horas) e possui menor sensibilidade que ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA (DOLZ e MORENO, 1999).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e padronização de um ELISA, visando a detecção e quantificação de anticorpos séricos contra o VLB, uma vez que a execução dessa técnica leva somente 1-2 horas, permitindo assim diagnósticos mais rápidos. Além disso, foram realizadas análises hematológicas com o objetivo de correlacionar o número de leucócitos com os níveis de anticorpos encontrados, uma vez que é conhecido que o vírus induz linfocitose persistente em aproximadamente 30% dos animais (FERRER, 1979).

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Foram coletadas amostras de sangue de 300 bovinos leiteiros das raças Holandês, Jersey e Mestiças provenientes de 44 propriedades dos municípios de Concórdia, Seara e Jaborá, SC. Em cada propriedade, foram amostrados 20% dos animais do rebanho. Por meio de venopunção na veia coccígea caudal, foram coletadas de cada animal duas amostras de sangue utilizando-se agulhas descartáveis e tubos com vácuo. Uma amostra de sangue foi coletada em tubo siliconizado sem anticoagulante e a outra em tubo com EDTA K₂. Após a formação do coágulo, a amostra coletada em tubo siliconizado sem anticoagulante foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante obtido foi alíquotado em tubo Eppendorf e armazenado a -20°C até a realização do ELISA. As amostras coletadas em tubos contendo EDTA K₂ foram utilizadas para a realização do leucograma, sendo estas amostras armazenadas a 4°C até a execução do teste, em um prazo máximo de doze horas. A contagem do número total de leucócitos foi

realizada em Câmara de Neubauer modificada, sendo as amostras de sangue diluídas na proporção de 1:20, utilizando-se líquido de Turk como diluente. Com as amostras de sangue também foram confeccionados esfregaços sanguíneos, utilizados para a contagem diferencial de leucócitos. Os esfregaços foram corados por panótico rápido. Em cada esfregaço sanguíneo foram diferenciados 100 leucócitos, de acordo com suas características morfológicas e tintoriais. Os leucócitos foram diferenciados em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

Para o teste de ELISA foram otimizadas variáveis como diluições de antígeno (Ag) e do soro primário (Ac) utilizando planejamento fatorial 2 em duplicata, com 2 variáveis (Ag e Ac) em doze e quatro níveis de variação, respectivamente. Os níveis de variação para Ag foram diluições de 1:10 a 1:20480; já os níveis de variação utilizados para o Ac foram diluições de 1:5 a 1:40. Em placas de 96 orifícios com fundo plano foram adicionados, por orifício, 100 μ L do antígeno diluído. O antígeno, o VLB, foi obtido comercialmente (TECPAR) na forma liofilizada, ressuspenso, conforme instruções do fabricante, e diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18-24 horas. Após a adsorção do antígeno, realizou-se cinco lavagens com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. O soro controle positivo (SCP) e soro controle negativo (SCN) foram diluídos em PBS-T, adicionados em duplicata na placa e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois de realizadas três lavagens foi adicionado em cada orifício 100 μ L do soro contra IgG bovina conjugado com peroxidase, na diluição 1:10.000. Após a incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, a placa foi lavada, seguida de adição de 100 μ L/orifício do revelador (TMB), incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e bloqueio da reação através do acréscimo de 50 μ L de solução contendo ácido sulfúrico. A densidade ótica (OD) foi lida em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

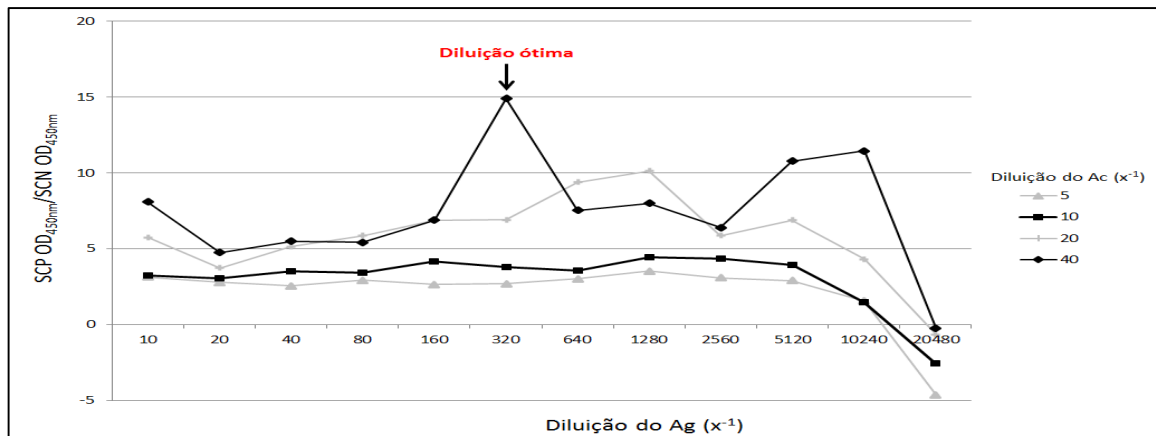
RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os valores obtidos no leucograma foram comparados aos valores de referência segundo THRALL (2006). Na contagem total de leucócitos, 2% e 33,33% das amostras apresentaram leucopenia ou leucocitose, respectivamente. Na

contagem diferencial, 25% das amostras mostraram monocitose, 26,3% linfocitose, 10,7% linfopenia, 8% eosinofilia, 20,3% neutrofilia e 1,3% neutropenia.

No ELISA, as diluições otimizadas foram determinadas a partir do maior valor obtido da relação da OD do SCP/OD do SCN, as quais foram: diluição 1:320 para o antígeno e diluição 1:40 para o soro (FIGURA 1).

Figura 1 – Relação da densidade ótica (OD) entre o soro controle positivo (SCP) e o soro controle negativo (SCN), obtidas com diferentes diluições de antígeno (Ag) e anticorpo (Ac).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

No ELISA, as variáveis podem sofrer influência mútua e o valor ideal pode depender da interação entre estas variáveis, portanto a otimização é primordial para o desenvolvimento do ELISA. Entretanto, ainda é necessária a validação do teste, para que se possa diferenciar animais soropositivos de animais soronegativos, procedimento este que se encontra em fase de andamento no nosso laboratório..

REFERÊNCIAS

- CAMARGOS, M. F. **Vírus da Leucemia Bovina: Epidemiologia molecular e diagnóstico**. 2005. 95f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAMARGOS, M. F.; MELO, C. B.; LEITE, R.C. et al. **Frequência de soropositividade para a Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos de Minas Gerais**. *Cien. Vet. Trop.*, v. 5, p. 20-26, 2002.
- DOLZ, G.; MORENO, E. **Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies**. *Zentralbl. Vetmed. BEIH.*, v. 46, n. 8, p. 551-558, 1999.

- FERNANDES, C. H. C. **Leucose Enzoótica dos bovinos: soroprevalência, fatores de risco e níveis séricos de lisozima em bovinos leiteiros do Estado do Tocantins, Brasil.** 2007. 89 f. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- FERRER J.F. **Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control.** J. Am. Vet. Med. Assoc., v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.
- GOFF, S. P. **Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication.** In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. v. 2, p. 1999-2069.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. **Bovine Leukemia Virus: Part IV. Economic Impact and Control Measures.** *Comp. Cont. Educ. Pract. Food Anim.*, v. 13, n. 11, p. 1727-1737, 1991.
- MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. **Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar.** *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 42, p. 171-179, 2005.
- MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; KURODA, T. F. et al. **Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu, São Paulo.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, p. 645-646, 2003.
- OTT, S.L.; JOHNSON, R.; WELLS S.J. **Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms.** *Preventive Veterinary Medicine*, 61: 249–262, 2003.
- PELZER, K. D. **Economics of Bovine Leukemia Virus Infection.** *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 13, n. 1, p. 129-141, 1997.
- POLETTO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, J. C. et al. **Prevalência de Brucelose, Tuberculose e Infecções Víricas em Bovinos Leiteiros do Município de Passo Fundo, RS.** *Ciência Rural*, v. 34, p. 595-598, 2004.
- RADOSTITS, O. M. et al. **Doenças causadas por vírus e Chlamydia.** In: RADOSTITS, O. M. et al. *Clínica Veterinária - um tratamento de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, cap. 21, p. 940-951.
- RAJÃO, D. S. **Efeito da infecção pelo vírus da leucose Enzoótica bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros.** 2008. 26 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- ROMERO, C. H.; ROWE, C. A. **Enzootic bovine leukosis vírus in Brazil.** *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 13, p. 107-111, 1981.
- THRALL, M. A. et al. **Considerações sobre leucócitos e leucograma.** In: THRALL, M. A. et al. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, cap. 10, p. 122, 2006.
- THURMOND, M. C.; LAPUZ, G. R.; FARVER, T. B. et al. **Retrospective study of four years of carcass condemnation rates for malignant lymphoma in California cows.** *Am. J. Vet. Res.*, v. 46, n. 6, p. 1387-1391, 1985.