

Protocolo de Immunoblotting para diag- nóstico da Artrite-Encefalite Caprina

Raymundo Rizaldo Pinheiro¹

Roberta Lemonte Lemos de Brito²

Apoliana de Sousa Rodrigues²

Ronaldo Pereira Dias²

Alice Andrioli¹

Aurora Maria Guimarães Gouveia³

Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma infecção causada por lentivírus e encontrada em todos os continentes (ADAMS et al., 1984), com alta prevalência nos rebanhos mais tecnificados para a produção leiteira (ROWE; EAST, 1997), causando consideráveis perdas econômicas para a produção caprina (BRITO, 2009). É uma enfermidade de caráter geralmente crônico que afeta caprinos de qualquer raça, sexo e faixa etária (CORK et al., 1974). A enfermidade se manifesta de forma contínua, incurável e apresenta como sintomas clínicos artrite, mamite, pneumonia e encefalite (PINHEIRO et al., 1999).

Devido aos custos menores e à praticidade, os métodos sorológicos são largamente usados na detecção de anticorpos contra os lentivírus caprinos (LVC), sendo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) os mais usados (PINHEIRO et al., 2006). Entretanto, existe o

problema de resultados falso-negativos produzidos por estes testes, principalmente no IDGA, o que compromete seriamente programas de controle desta enfermidade.

Ding e Xiang (1997) estudando a resposta imune para o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), em cabras infectadas experimentalmente, pesquisaram anticorpos, através do Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA-i) e de *immunoblotting*. O *immunoblotting* detectou anticorpos para core proteína p28 já aos 4 dias pós-infecção (PI), enquanto no ELISA-i os anticorpos foram detectados 15 a 20 dias PI. Com estes resultados comprovou-se a alta sensibilidade do *immunoblotting* para detecção precoce de anticorpos para o CAEV. Celer Júnior et al. (1998) utilizando antígeno elaborado com a partícula viral completa para detecção de animais infectados pelo lentivírus ovino, aplicaram o *immunoblotting* para dirimir resultados discordantes encontrados entre os testes ELISA e IDGA. Apesar de ser considerado como *gold test* (padrão ouro) não se conhece a sensibilidade relativa

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

² Bolsista de Iniciação Científica, Embrapa Caprinos e Ovinos

³ Profa, Universidade Federal de Minas Gerais

do *immunoblotting* para detecção de anticorpos para LVC (KNOWLES, 1997).

O *immunoblotting* ou *Western blotting* (WB) em princípio, pode ser delineado como método onde proteínas (anticorpos séricos ou plasmáticos) podem ser imobilizadas em uma membrana ou transferidas por capilaridade, difusão ou forças elétricas. As forças de ligação da membrana podem ser de natureza covalente ou não-covalente. O material protéico deve ser separado antes da transferência por eletroforese. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação (BJERRUM; HEEGAARD, 1988). Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa vem sendo utilizada em lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas virais dos LVC. Entretanto, a Embrapa Caprinos e Ovinos padronizou uma rotina da técnica de *immunoblotting*, com o objetivo de agilizar as etapas de sua realização.

Protocolo

Produção do antígeno

Na produção de suspensões e titulações do LVC são utilizados cultivos secundários de células de membrana sinovial caprina (MSC) obtida por explante a partir de cabrito com menos de dois meses de idade comprovadamente negativo para LVC.

Para a produção da suspensão viral, utilizou-se amostra padrão (CAEV-Cork) do LVC com título inicial de $10^{5,3}$ TCID₅₀/mL. Monocamadas semiconfluentes (70 a 90% de confluência) de MSC cultivadas em garrafas tipo *roller* são inoculadas, 72 a 96 horas após passagem, com 200 doses formadoras de sincício/MI. Coleta-se o sobrenadante, semanalmente, por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada. Os sobrenadantes coletados, bem como as garrafas utilizadas na última coleta são conservadas a -80°C para produção do antígeno.

Na produção do antígeno, os sobrenadantes das coletas iniciais e o conteúdo das garrafas congeladas sofrem dois ciclos de congelamento e descongelamento e são clarificados por centrifugação a 3.300g a 4°C por 20 minutos. A suspensão clarificada é precipitada com polietilenoglicol - PEG-8000 a 40%

até a concentração final de 8%, por 18 h a 4°C , sob lenta agitação, seguida de nova centrifugação a 4°C a 12000g por 60 minutos (REIS; LEITE, 1994). O sedimento é suspenso em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0 mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral e ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42000 g por 120 min a 4°C (HOUWERS et al., 1982). O sedimento é suspenso em PBS (0,05M; 0,15M NaCl; pH 7,4) contendo 2×10^{-4} M de *phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF). A concentração de proteína total é determinada pelo método de Lowry et al. (1951) e o antígeno mantido a 4°C até a realização dos ensaios imunoenzimáticos.

Immunoblotting (Western blotting)

No *immunoblotting* as proteínas do antígeno inicialmente são separadas por eletroforese em gel de Agarose com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme protocolo descrito por (LAEMMLI, 1970) e transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (MN) através do trans-blot por 60 minutos a 100 volts e 350 mA (TOWBIN et al., 1979). Após a transferência para MN as proteínas são bloqueadas com solução de bloqueio (PBS Tween 0,3%) por 60 minutos e lavadas com solução de lavagem (PBS Tween 0,05%) por três vezes, cinco minutos cada. O soro positivo do kit comercial (Veterinary Diagnostic, ICA - USA) é diluído (1:50) e aplicado por 90 minutos. Após o processo de lavagem citado anteriormente é colocado conjugado de coelho anti-cabra peroxidase (SIGMA) diluído (1:15000) em PBS, por 60 minutos. A MN é novamente lavada com PBS Tween 0,05% por três vezes, cinco minutos cada e com PBS, duas vezes, cinco minutos cada. A MN é revelada numa solução de DAB/4-Cloronapthtol (solução A- 12 mg de Diaminobenzidine em 12mL de PBS, solução B- 5mg de 4-Chloronapthol) adicionado a 2 mL de metanol mais 10 mL de PBS. As duas soluções são misturadas e posteriormente são adicionados 10 μL de H_2O_2 a 30% por 10 a 15 minutos ao abrigo da luz. Todas as etapas, com exceção da revelação, são realizadas sob agitação. No final, a MN é lavada com água destilada e secada em papel de filtro.

As bandas de proteínas do vírus presentes no gel SDS-PAGE a 12,5% foram medidas e apresentaram os pesos moleculares: 14; 22; 26; 29; 33; 36; 39; 43; 55; 67; 79; 86; 95; 103; 115; 127; 135 e 142 Kda, respectivamente. Porém após a transferência e a reação imunoenzimática somente algumas proteínas

foram evidenciadas, dentre elas as proteínas de 14 KDa, 28 KDa; 43 KDa e a 67KDa. A banda protéica mais visível foi da proteína do capsídeo viral cujo peso molecular é de 28 Kda (seta) e representa o maior componente estrutural do núcleo (ZEE; HIRSH, 2003), sendo a proteína de base para a interpretação do WB (Figura 1).

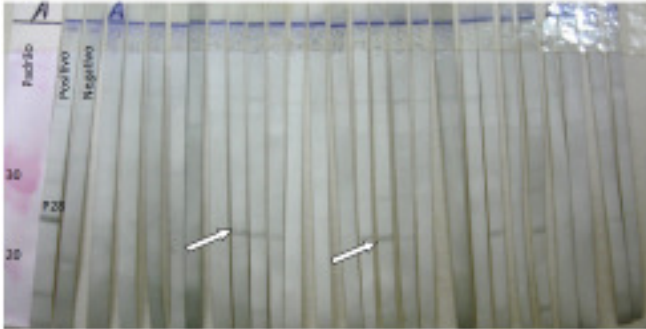


Figura 1. Teste de *Western Blotting* para o diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina. Detecção da proteína viral p28 (seta).

Agradecimentos

À Embrapa Caprinos e Ovinos por ter fornecido as condições necessárias para realização do estudo, ao Banco do Nordeste, CNPq e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

Referências

- ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E.; DeMARTIM, J. C.; VERWOERD, D. W.; HOUWERS, D. J.; WAGHELA, S.; GORHAM, J.R.; HYLLSETH, B.; DAWSON, M.; TRIGO, F.J.; McGITIRE, T. C. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Record**, v. 115, p. 493-495, 1984.
- BJERRUM, O. J.; HEEGAARD, N. H. H. **Handbook of immunoblotting of proteins: technical descriptions**. Florida: CRC Press, 1988. v. 1. 265 p.
- BRITO, R. L. L. **Implicações da Artrite-Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade de leite de cabras**. 2009. 109 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.
- CELER JÚNIOR, V.; CELER, V.; NÉMCOVÁ, H.; ZANONI, R. G.; PETERHANS, E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. **Journal of Veterinary Medicine. Series B**, v. 45, p. 183-188, 1998.
- CORK, L. C.; HADLON, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **The Journal of Infectious Disease**, v. 129, p. 134-141, 1974.
- DING, E. Y.; XIANG, W. H. Immune response in goats to caprine arthritis-encephalitis virus. **Viral Immunology**, v. 10, n. 2, p. 111-115, 1997.
- HOUWERS, D. J.; GIELKENS, A. L. J.; JAN SCHAAKE, J. R. J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. **Veterinary Microbiology**, v. 7, n. 3, p.209-219, 1982.
- KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, p. 1-11, 1997.
- LAEMMI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 2655-2755, 1951.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ANDRIOLI, A. Presença da Artrite-Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 421-423, 1999.
- PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAÚJO, S. C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Carina em Caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 557-558, 2006.
- REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, p. 261-267, 1994.
- ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 35-53, 1997.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.76, n. 9, p. 4350-4354, Set., 1979.

ZEE, Y. C.; HIRSH, D. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446 p.

**Comunicado
Técnico,
111
On line**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE

Fone: (0xx88) 3112-7400

Fax: (0xx88) 3112-7455

Home page: www.cnpc.embrapa.br

SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm>

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição

On line (Setembro/2010)

Fotos e Ilustrações: Lea Chapaval

**Comitê de
publicações**

Presidente: *Marco Aurélio Deolmondes Bomfim*

Secretário-Executivo: *Alexandre César Silva Marinho*

Membros: *Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)*

Expediente

Supervisão editorial: *Alexandre César Silva Marinho.*

Revisão de texto: *Carlos José Mendes Vasconcelos.*

Normalização bibliográfica: *Tânia Maria Chaves Campelo.*

Editoração eletrônica: *Alexandre César Silva Marinho.*