

COMUNICADO
TÉCNICO

178

Sobral, CE
Novembro, 2018



Conservação do antígeno utilizado no teste de imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus caprino: Efeitos da adição de conservante e de diferentes temperaturas.

Alice Andrioli Pinheiro
Raymundo Rizaldo Pinheiro
Kelma Costa de Souza

Conservação do antígeno utilizado no teste de imunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus caprino: Efeitos da adição de conservante e de diferentes temperaturas. ¹

¹ Alice Andrioli Pinheiro, médica-veterinária, doutora em Ciência Animal, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/Ceará
Raymundo Rizaldo Pinheiro, médico-veterinário, doutor em Ciência Animal, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/Ceará
Kelma Costa de Souza, zootecnista, doutora em Ciências Veterinárias, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/Ceará

Introdução

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade causada por lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV), caracterizada pela evolução crônica e manifestações clínicas progressivas até a morte (Blacklaws, 2012). Diferentes sinais clínicos da CAE são conhecidos, sendo os principais: artrite, pneumonia, encefalite e mastite, além de perda de peso progressiva (Souza et al., 2015). Essa enfermidade causa importante perda econômica, principalmente pela redução da produção láctea e queda da qualidade do leite (Martínez-Navalón et al., 2013). Quanto ao diagnóstico, o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é o exame mais utilizado em razão de seu baixo custo e rápido resultado, sendo recomendado

pela Organização Mundial da Saúde Animal – OIE (Arruda et al., 2011). O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade do antígeno (Ag) para diagnóstico de lentivírus caprino por meio do teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em diferentes temperaturas, com e sem a adição do conservante Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF).

Material e métodos

Produção do antígeno

Utilizou-se amostra do vírus CAEV-Cork1 com título de $10^{4,5}$ TCID₅₀/mL multiplicada em membrana sinovial caprina (MSC) para a produção viral. A inoculação foi realizada em monocamadas de MCS cultivadas por 72h

¹ CAEV-Cork.

a 96h após passagem, obtendo-se monocamada semiconfluente (70% a 90% de confluência) e solução viral de 200 doses formadoras de sincícios. O sobrenadante (SN) coletado foi clarificado por centrifugação e concentrado pelo sistema AMICON®. O SN foi concentrado 100 vezes do volume original (Alves et al., 2012).

Análise da conservação do antígeno (temperatura e conservante)

O antígeno foi homogeneizado e aliquotado (em triplicata), para os seguintes tratamentos: temperatura (temperatura ambiente, 4 °C, -20 °C e -80 °C) e conservante (com e sem PMSF) e testado nos dias zero, três, sete, 15, 30, 60 e 90. A temperatura ambiente nos dias do experimento variou de 21 °C a 28 °C com média de 25 °C. Para cada um dos tratamentos foi feita uma diluição seriada do soro positivo do kit americano para teste diagnóstico² frente ao Ag e outra, do Ag frente ao soro positivo. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Lowry (1951).

² Veterinary Diagnostic Technology, Inc.

³ *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®*, USA. Este *kit* é composto por 1 mL de antígeno (p28 e gp135) produzido com o MVV, 3 mL de soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp135, 0,5 mL de soro positivo (soro rico em anticorpos contra as proteínas p28 e gp135), 0,5 mL de soro fraco-positivo (soro pobre em anticorpos contra a gp135 e sem anticorpos contra a p28) e soro negativo (soro sem anticorpos contra as proteínas p28 e gp135).

Teste de imunodifusão em gel de Ágar IDGA

Foi utilizada a micro técnica de IDGA descrita por Gouveia (1994) em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30 ml de soro ou antígeno com a leitura realizada em 48h e 72h, sobre fundo escuro e luz indireta, sendo considerada definitiva a última leitura. Como controle, utilizou-se soro positivo do kit americano de IDGA para diagnóstico da CAE por IDGA³.

Teste de Western Blotting (WB)

O teste de WB seguiu o protocolo de Rodrigues et al. (2014), e foi realizado para identificar as proteínas virais imunológicas. Realizando-se eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970), com géis de concentração e separação a 4% e 12,5%, respectivamente. Em seguida, ocorreu a transferência das proteínas contidas no gel para membrana de nitrocelulose, previamente bloqueadas com PBS Tween a 0,3%. A técnica foi realizada com diluição de 1:50 do soro positivo do kit americano de IDGA para diagnóstico da CAE e com conjugado IgG coelho anticabra peroxidase (Sigma® cat.

A5420) a 1:15000. A revelação das bandas de proteína ocorreu ao abrigo da luz, com os substratos 4-Cloro-1-Naphthol e 3,3' Diaminobenzidine (DAB), com peróxido de hidrogênio a 30% e parada pela adição de água destilada.

Resultados

A dosagem de proteína indicou que houve redução dos níveis proteicos do antígeno em temperatura ambiente no 90º dia em relação ao dia zero, sendo que essa redução foi menor no antígeno tratado com PMSF. As alíquotas mantidas sob refrigeração (4 °C) e congelamento (-20 °C) e tratadas com PMSF mantiveram praticamente a mesma quantidade proteica no 90º dia, enquanto que as alíquotas sem o conservante sofreram pequena redução. Quando avaliadas, as alíquotas congeladas a -80 °C, ambas (com e sem PMSF), apresentaram nível proteico semelhante ao dia zero (Figura 1 e Tabela 1).

No teste de IDGA (Figura 2 e Tabela 2) a diluição máxima do antígeno no dia zero que permitiu a detecção de anticorpos foi 1:4. Verificou-se a formação de linhas de precipitação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) nessa diluição em todos os tratamentos até o dia 15º dia.

A partir do dia 30º dia são observadas perdas graduais na sensibilidade do IDGA em detectar anticorpos nas alíquotas de antígeno mantidas em temperatura ambiente. Sob essa condição, nos 30º dia e 60º dia, a detecção ocorreu na diluição máxima 1:2, e no 90º dia o antígeno funcionou apenas puro e somente no tratamento sem conservante. Nas alíquotas de antígeno mantidas em 4 °C, foi observado linha de precipitação de Ag-Ac no 90º dia, sem o conservante, até a diluição 1:2.

No teste de WB, verificou-se que a principal proteína imunogênica era a do capsídeo viral p28 e, portanto, muito provavelmente corresponde à linha de precipitação formada no teste de IDGA.

Tabela 1. Dosagem de proteína total (mg/mL) nas alíquotas de antígeno de Lentivírus Caprino submetidas a diferentes temperaturas e tratadas ou não com conservante.

	Antígeno com PMSF		Antígeno sem PMSF	
	Dia 0	Dia 90	Dia 0	Dia 90
TA	201,64	156,25	201,64	134,76
4 °C	201,64	196,09	201,64	178,91
-20 °C	201,64	200,81	201,64	183,59
-80 °C	201,64	196,09	201,64	197,65

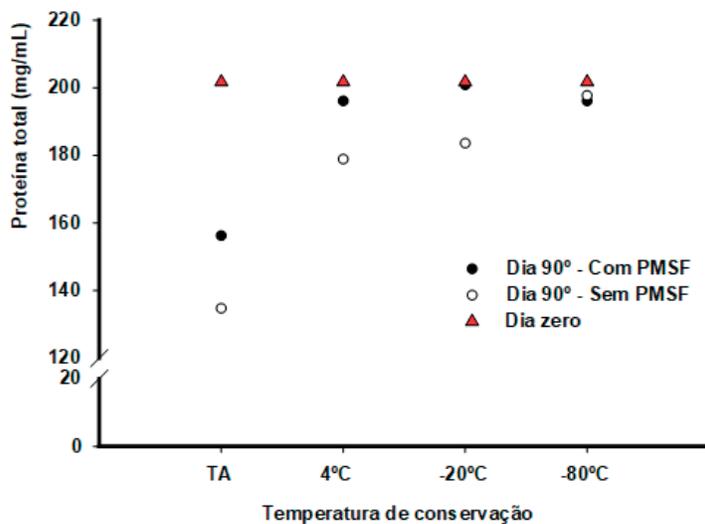


Figura 1. Valores da Proteína Total (mg/mL) no antígeno de Lentivírus Caprino submetido à temperatura ambiente (TA), diferentes temperaturas de conservação e com ou sem a presença de conservante.

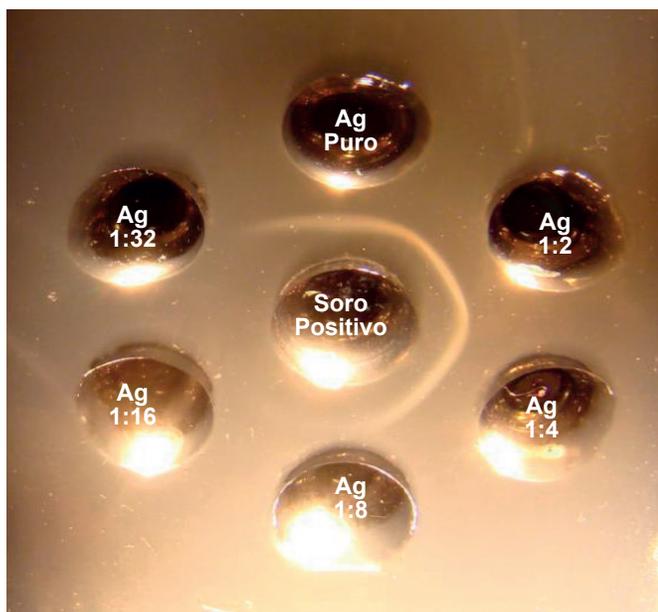


Figura 2. Formação de linhas de precipitação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) no teste de imunodifusão em gel de ágar no antígeno puro e nas diferentes diluições de.

Conclusões

A proteína do capsídeo viral - p28 presente no antígeno é bem estável, suportando a temperatura ambiente média de 25 °C por até 15 dias.

A ação do conservante PMSF é efetiva para a manutenção dos níveis proteicos, além disso, é quase inerte na formação da linha de precipitação.

O congelamento a -20 °C e, principalmente a -80 °C, com ou sem a adição de conservante, é muito eficaz para a manutenção da quantidade e qualidade da proteína viral p28 presentes no antígeno de Lentivírus Caprino, sendo dispensável o uso do conservante.

Referências

ALVES, L. A. O.; TEIXEIRA, M. F. S.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; DIAS, R. P.; BRITO, R. L. L.; LOPES JÚNIOR, C. A. F.; BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; AZEVEDO, D. A. A. Produção de antígeno e separação da proteína p28 por microfiltragem seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina por ensaio imunoenzimático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 935-942, 2012. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/77585/1/API-Producao-de-antigeno.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

ARRUDA, E. T. de; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A. do; CAMPOS, A. C.; CASTRO, R. S. de. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para Diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 560-565, jul./set. 2011.

BLACKLAWS, B. A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. **Comparative Immunology Microbiology and Infection**

Diseases, v. 35, n. 3, p. 259-269, May, 2012. DOI: 10.1016/j.cimid.2011.12.003.

GOUVEIA, A. M. G. **Relatório de consultoria: setor de sanidade animal**. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1994. 127 p.

LAEMMI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 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, n. 1, p. 2655-2755, Nov. 1951.

MARTÍNEZ-NAVALÓN, B.; PERIS, C.; GÓMES, E. A.; PERIS B, ROCHE ML, CABALLERO C, GOYENA E, BERRIATUA E. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 311-317, Aug. 2013. DOI: 10.1016/J.TVJL.2012.12.020.

RODRIGUES, A. S.; BRITO, R. L. L.; PINHEIRO, R. R.; DIAS, D. P.; ALVES, S. M.; SOUZA, T. S.; SOUZA, K. C.; AZEVEDO, D. A. A.; PINHEIRO, A. A.; MAGALHÃES, D. C. T.; TEIXEIRA, M. F. S. Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 66, n. 2, p. 417-424, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/112082/1/ap-Padronizacao.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

SOUZA, T. S. de; PINHEIRO, R. R.; COSTA, J. N.; LIMA, C. C. V. de; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, D. A. A. de; ARAÚJO, J. F.; SOUSA, A. L. M. de; PINHEIRO, D. N. S.; FERNANDES, F. M. C.; COSTA NETO, A. O. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 867-874, July/Sept. 2015. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/138226/1/CNPC-2015-Interspecies-transmission.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos
Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/
Goiatras, Km 4 Caixa Postal: 71
CEP: 62010-970 - Sobral, CE
Fone: (88) 3112-7400
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
On-line (2018)



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

GOVERNO
FEDERAL

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Caprinos e Ovinos

Presidente
Vinicius Pereira Guimarães

Secretário-Executivo
Alexandre César Silva Marinho

Membros
*Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Carlos
José Mendes Vasconcelos, Cícero Cartaxo
de Lucena, Fábio Mendonça Diniz, Manoel
Everardo Pereira Mendes, Maira Vergne Dias,
Zenildo Ferreira Holanda Filho, Tânia Maria
Chaves Campêlo*

Supervisão editorial
Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto
Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização bibliográfica
Tânia Maria Chaves Campêlo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Francisco Felipe Nascimento Mendes

Foto da capa
Raymundo Rizaldo Pinheiro

SISGEN/CNPC AE94471

CGPE 14.970