

## Dot-Blot: Alternativa para o Diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina (AEC)

Raymundo Rizaldo Pinheiro<sup>1</sup>  
Aurora Maria Guimarães Gouveia<sup>2</sup>  
Carlos Chaves Olortegui<sup>3</sup>  
Alice Andrioli<sup>1</sup>  
Simone Costa Araújo<sup>4</sup>

A artrite encefalite caprina (AEC) é uma infecção causada por lentivírus, encontrada em todos os continentes com alta prevalência nos rebanhos mais tecnificados para a produção leiteira, causando consideráveis perdas econômicas para a produção caprina.

O controle da AEC baseia-se no teste sorológico dos animais, seguido de separação ou sacrifício dos soropositivos, associado a medidas de manejo que visam a separação precoce das crias, alimentadas artificialmente com colostro e leite tratados termicamente ou sucedâneos do leite. Devido aos custos menores e à praticidade, os métodos sorológicos são largamente usados na detecção de anticorpos contra os

lentivírus de pequenos ruminantes (LVC), sendo a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e o *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) os mais usados.

Existe um interesse crescente no diagnóstico sorológico dos LVC usando técnicas rápidas, simples e de baixo custo. O *Dot-Blot* (DB) é um teste atrativo para aplicação de rotina, em virtude dos procedimentos permitirem a realização de dezenas de ensaios em membrana de nitrocelulose para detecção de anticorpos com alta sensibilidade. Apesar destas qualidades não existe nenhum trabalho na literatura referente à utilização deste teste no diagnóstico dos LVC. Este comunicado técnico relata a padronização do *Dot-Blot*

<sup>1</sup>Médico Veterinário, D.Sc. em Ciência Animal. Pesquisador da Embrapa Caprinos, Sobral, CE. E-mail: rizaldo@cnpq.embrapa.br

<sup>2</sup>Médica Veterinária, D.Sc. Professora Adjunta do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. E-mail: aurora@vet.ufmg.br

<sup>3</sup>Pesquisador da Fundação Ezequiel Dias FUNED. Ph.D.

<sup>4</sup>Doutoranda do ICB-UFMG. M.Sc.

para o diagnóstico da AEC e compara este teste com o ELISA-indireto (ELISA-i) e a IDGA.

Foram avaliados a sensibilidade relativa, a especificidade relativa, o valor preditivo positivo e negativo, e a eficiência (habilidade do um teste identificar corretamente todos os indivíduos positivos e negativos).

A padronização do DB foi realizada através de uma série de simulações variando a quantidade de proteína de Ag por poço, o bloqueio, bem como as diluições de soro e do conjugado. O melhor resultado obtido foi: MN sensibilizada com 0,5µg de proteína do antígeno, bloqueada com uma solução de PBS/Caseína 2%, diluição de 1:50 soros e conjugado coelho anti-cabra peroxidase, numa diluição de 1:500 (Figura 1).

O ELISA foi realizado conforme determinações da OIE/FAO. Quanto ao IDGA foi utilizada a microtécnica realizada em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30 µl de soro/antígeno (Ag) comercial<sup>5</sup>.

O teste ELISA-i detectou 209 caprinos positivos, o DB detectou 200, enquanto a IDGA detectou 144 animais (Tabela 1). Presumindo o ELISA-i como o teste referência, a comparação com o DB revelou concordância de 90,2% ( $p < 0,001$ ) no teste de 327 amostras de soro caprino.

**Tabela 1.** Resultado do teste de soros caprinos pelo IDGA, ELISA-i e *Dot-Blot* para o diagnóstico da infecção por LVC.

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA	144	44,04	183	55,96	327
<i>Dot-Blot</i>	200	61,16	127	38,84	327
Elisa Ind*	209	63,91	118	36,09	327

\* Positivo (DO > 11,72% em relação ao padrão positivo).  
Negativo (DO < 11,72% do pp).



Quantidade de antígeno 0,5 g/poço  
Diluição do conjugado 1:500  
Diluição do soro 1:50

**Fig. 1.** Resultado final do *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico de LVC de um pool de soros positivos, fracos positivos e negativos, testados pelo IDGA.

Diante dos resultados (Tabela 2) observa-se que o DB é um teste com ótima sensibilidade e uma boa especificidade. Segundo a classificação do índice Kappa, o DB apresentou uma excelente concordância com o ELISA-i (Kappa > 0,8).

**Tabela 2.** Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), eficiência (Efic), índice Kappa e qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para IDGA e *Dot-Blot* em relação ao ELISA-i de 327 amostras de soro caprino.

Teste	Sens	Espec	VPP	VPN	Efic	Kappa	$\chi^2$ *
IDGA	65,6	94,1	95,1	60,7	75,8	0,53138,16	( $p < 0,001$ )
<i>Dot-Blot</i>	91,4	92,4	95,5	85,8	91,7	0,83102,53	( $p < 0,001$ )

\* - Qui-quadrado com correção de Yates.

O DB utilizando o vírus completo da amostra CAEV Cork foi superior ao teste IDGA e semelhante ao ELISA-i. O protocolo desenvolvido apresentou boa resolução e reação inespecífica baixa além de um bom rendimento. Portanto o DB é um teste mais viável que a IDGA e o ELISA indireto para utilização no controle desta infecção, pois além de ser mais sensível

que a IDGA, não necessita dos equipamentos do ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e consequentemente mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões, etc) ou até mesmo no campo.

A eficiência de programas de controle dos LVC depende da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização em animais de um determinado rebanho e no manejo utilizado neste mesmo rebanho. Nos programas de controle ou erradicação, testes com maior sensibilidade e especificidade devem ser utilizados quando ocorrer uma redução substancial dos animais soropositivos, testados pelo teste de IDGA, e quando a taxa de soroconversão no rebanho, apesar de baixa, é mantida.

#### Bibliografia Consultada

- 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.; McGUIRE, T.C. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis vírus infection. **Veterinary Record**, v. 115, p. 493-495, 1984.
- GOUVEIA, A.M.G. **Relatório de consultoria**: Setor de Sanidade Animal. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC, 1994. 127p.
- GOUVEIA, A.M.G.; COURA, M.A.; BRANDÃO, H.M.; ATANÁSIO, C. Distribuição sorológica do lentivírus caprino em amostragem por demanda. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 16., 1998, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 1998. p. 116. Resumo.
- GOUVEIA, A.M.G.; SANTA ROSA, J.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.F.; SOUTO VIDAL, C.E. Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Recife. **Anais...** Recife: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1994. p. 102. Resumo.
- GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 22, n. 1/2, p. 71-87, 1995.
- PINHEIRO, R.R. **Vírus da artrite encefalite caprina**: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 115p. Tese Doutorado.
- ROWE, J.D.; EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis vírus infection. **Veterinary Clinics North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 35-53, 1997.

THRUSFIELD, M.V. **Veterinary epidemiology**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1995. 79p.

WRIGHT, P.F.; NILSSON, E.; VAN ROOIJ, E.M.A.; LELENTA, M.; JEGGO, M.H. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique Technique**, v. 12, p.435-450, 1993.

#### Comunicado Técnico, 57

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA  
E DO ABASTECIMENTO



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Caprinos**  
Endereço: Estrada Sobral/Groáiras, Km 04 Caixa  
Postal D 10, CEP 62011-970 Sobral, CE  
Fone: (0xx88) 677-7000  
Fax: (0xx88) 677-7055  
Home-page: <http://www.cnpc.embrapa.com.br>  
E-mail: [sac@cnpc.embrapa.br](mailto:sac@cnpc.embrapa.br)

1ª edição

1ª impressão (2001): 500 exemplares

#### Comitê de Publicações

Presidente: *Ângela Maria Xavier Eloy*  
Secretário-Executivo: *Francisco Selmo Fernandes Alves*  
Membros: *José Ubiraci Alves*  
*Luiz da Silva Vieira*  
*Tânia Maria Chaves Campêlo*

#### Expediente

Supervisor editorial: *Tânia Maria Chaves Campêlo*  
Tratamento das ilustrações: *Raymundo Rivaldo Pinheiro*  
Editoração eletrônica: *Fábio de Sousa Fernandes*