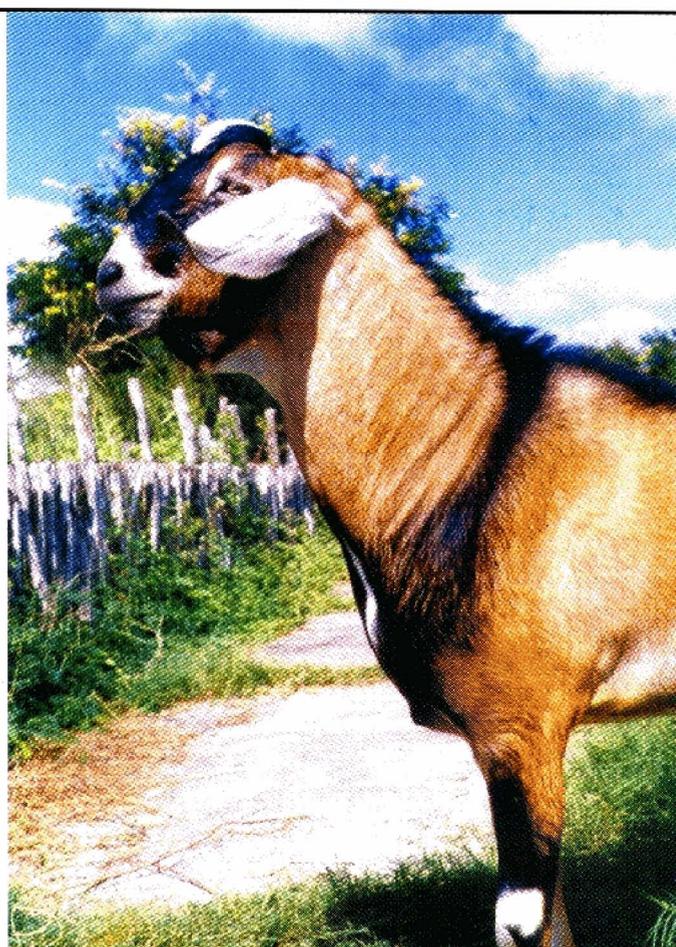
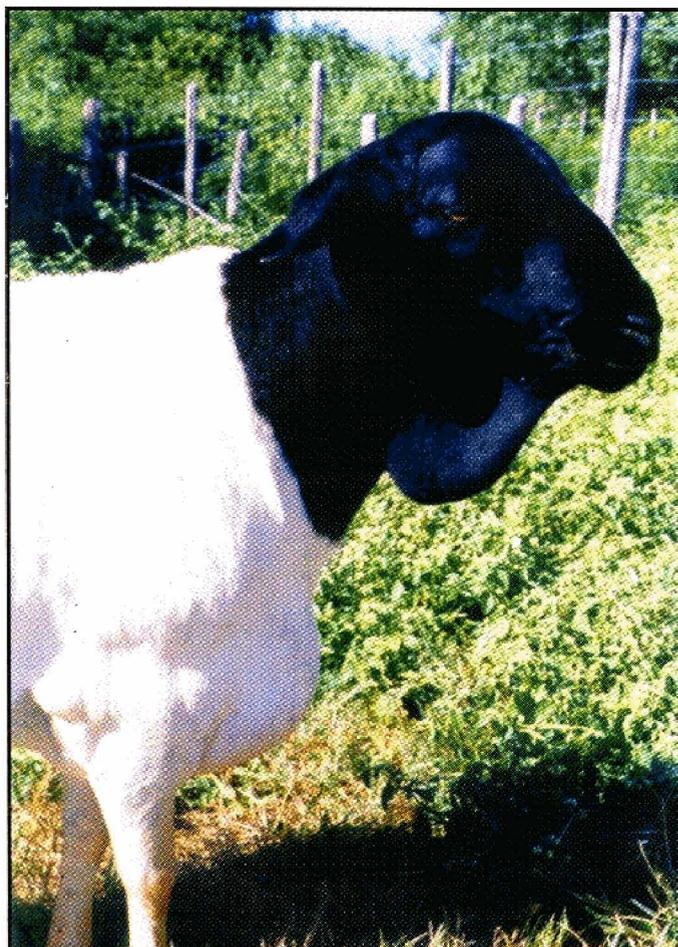


Importância do Diagnóstico Precoce de Doenças em Pequenos Ruminantes



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente da República

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinícius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerthard Quast

José Honório Accarini

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Diretores-Executivos

Embrapa Caprinos

Aurino Alves Simplício
Chefe-Geral

Luiz da Silva Vieira

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Eliene da Silva Dourado
Chefe-Adjunto de Administração



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1676-7659

Dezembro, 2002

Documentos 43

Importância do Diagnóstico Precoce de Doenças em Pequenos Ruminantes

Raymundo Rizaldo Pinheiro
Francisco Selmo Fernandes Alves
Alice Andrioli

Sobral, CE
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Estrada Sobral/Groaíras, 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.br>

E-mail: sac@cnpc.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Ângela Maria Xavier Eloy*

Secretário-Executivo: *Alice Andrioli*

Membros: *Eneas R. Leite*

Alcido E. Wander

Tânia Maria Chaves Campêlo

Supervisão editorial/Normalização bibliográfica: *Tânia Maria C. Campêlo*

Revisão gramatical: *José Ubiraci Alves*

Editoração eletrônica: *Fábio de Sousa Fernandes*

1ª edição

1ª impressão (2002): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Pinheiro, Raymundo Rizaldo.

Importância do diagnóstico precoce de doenças em pequenos ruminantes / Raymundo Rizaldo Pinheiro, Francisco Selmo Fernandes Alves, Alice Andrioli. Sobral : Embrapa Caprinos, 2002.

27p. Il. 21 cm. (Embrapa Caprinos. Documentos, 43).

1. Caprino Doença - Diagnóstico; 2. Ovino Doença Diagnóstico; 3. Doença animal. I. Alves, Francisco Selmo Fernandes; II. Andrioli, Alice. III. Embrapa Caprinos; IV. Título; V. Série

CDD 636.0896

© Embrapa 2002

Autores

Raymundo Rizaldo Pinheiro

Méd., Vet., D.Sc., em Ciência Animal

Embrapa Caprinos

Estrada Sobral/Groaíras, km 4

Sobral, CE, CEP 62011-970

E-mail: rizaldo@cnpq.embrapa.br

Francisco Selmo Fernandes Alves

Méd., Vet., Ph.D., em Microbiologia Veterinária

Embrapa Caprinos

E-mail: selmo@cnpq.embrapa.br

Alice Andrioli

Méd., Vet., D.Sc., em Ciência Animal

Embrapa Caprinos

E-mail: alice@cnpq.embrapa.br

Apresentação

É sempre importante ressaltar que o aprimoramento de qualquer atividade pecuária depende de uma constante atuação no tocante aos avanços científicos, tecnológicos e mercadológicos. Da dinâmica com que estes fatores são assimilados pelo setor produtivo depende o sucesso do empreendimento em uma economia baseada na competitividade.

Para uma melhor compreensão, os fatores podem ser divididos em dois grupos, sendo o primeiro relacionado à produção e o segundo à comercialização. A produção, que abrange a produtividade e a qualidade do produto, depende basicamente da sanidade, da alimentação e da genética dos animais. A comercialização, por seu turno, é determinada pelos preços dos insumos, custo final do produto, preço de mercado e pela estratégia de marketing adotada.

No tocante ao fator sanidade, que representa o objetivo específico deste trabalho, é importante considerar o fato de que se os rebanhos estivessem livres de todas as doenças o custo de produção seria significativamente reduzido, o que facilitaria sua comercialização em virtude do preço e da qualidade final do produto. Entretanto, como esta situação dificilmente é encontrada em uma unidade produtiva, o sistema de manejo sanitário deve ser planejado de forma a minimizar o impacto econômico causado pelas enfermidades. Isto implica na tentativa de erradicação de alguns patógenos e no controle de outros, buscando uma condição sanitária compatível com as necessidades de cada propriedade e de cada região. Dentro desta perspectiva, é necessário estabelecer programas para a divulgação e adoção dos conhecimentos voltados para o incremento do manejo sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos.

O presente documento trata de um importante segmento do manejo sanitário, o diagnóstico precoce das doenças. Tratado com didática simples e de fácil compreensão, o trabalho poderá ser utilizado por todos aqueles que lidam com a produção de pequenos ruminantes, especialmente técnicos e produtores, sendo também interessante fonte de consulta para profissionais e estudantes de Medicina Veterinária.

Eneas Reis Leite
Pesquisador Embrapa Caprinos

Sumário

Introdução	9
Impacto das enfermidades no sistema de produção de caprinos e ovinos	10
Métodos de diagnóstico	13
Diagnóstico precoce	14
Métodos de diagnóstico precoce	15
Métodos diretos	16
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	16
Hibridização <i>in situ</i>	18
Ensaio imunoenzimático	18
Métodos indiretos	18
Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)	19
Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	20
Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI)	21
<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	22
<i>Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-imunoblotting)</i>	22
<i>Immunoblotting ou Western Blotting</i>	23
Perspectivas - Marcadores moleculares para detecção de genótipos resistentes a enfermidades	24
Considerações Finais	25
Referências Bibliográficas	25

Importância do Diagnóstico Precoce de Doenças em Pequenos Ruminantes

*Raymundo Rizaldo Pinheiro
Francisco Selmo Fernandes Alves
Alice Andrioli*

Introdução

Na produção de caprinos e ovinos, o sucesso do empreendimento depende de vários fatores, entre os quais figuram, com destaque, as práticas sanitárias. Estas, quando organizadas em um sistema de informações, fornecem os elementos essenciais acerca da diversidade e magnitude dos problemas de saúde prevalentes numa região, podendo contribuir para as reais necessidades da produção, seja leite, carne e pele.

É patente a impossibilidade de quantificação da ocorrência de doenças em populações, sem que se disponha de um sistema adequado para sua identificação, o qual se apoia, essencialmente, em dois componentes fundamentais:

- Existência de recursos operacionais, configurados numa política nacional e regional de saúde, dotada de toda estrutura institucional (oficial e particular) com profissionais treinados e capacitados;

- Disponibilidade de métodos de diagnósticos confiáveis, práticos, rápidos e de baixo custo.

Vale salientar que, qualquer que seja a natureza da enfermidade, todo o processo para seu tratamento, controle e/ou erradicação, se inicia com o diagnóstico. Entretanto, o diagnóstico não constitui um fim em si mesmo, se não, numa etapa fundamental que desencadeia uma série de ações. O diagnóstico tem grande importância epidemiológica em um rebanho ou região produtora, pois possibilita o planejamento de atividades multidisciplinares e institucionais no sentido de traçar medidas de controle e/ou prevenção das doenças. No animal, individualmente, um diagnóstico precoce conduz normalmente a um tratamento rápido e eficaz.

Impacto das enfermidades no sistema de produção de caprinos e ovinos

As enfermidades infecciosas e parasitárias determinam grandes prejuízos à caprino-ovinocultura e, indiretamente, à saúde pública. Como exemplo, apresenta-se o custo necessário para o tratamento de algumas enfermidades de pequenos ruminantes (Tabela 1).

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) foi introduzida no Brasil a partir de 1978, através da importação de animais para melhoramento leiteiro. Hoje, ela se encontra disseminada por todas as regiões (mais de 14 Estados já constataram o problema com prevalência variando entre 3% a 49%), causando sérias perdas nesta atividade produtiva. Outra enfermidade em evidência é a Febre Aftosa, que constitui uma forte barreira sanitária e comercial para a exportação. Várias outras enfermidades também causam perdas econômicas nesta atividade, tais como: Linfadenite Caseosa, Helmintoses, Eimeriose, Clostridioses, dentre outras.

Tabela 1. Estimativa do custo de tratamentos por animal, de algumas das principais enfermidades de pequenos ruminantes.

Enfermidades	Discriminação	Valor (US\$)	Valor (R\$)
Linfadenite Caseosa	Medicamentos	1,44	3,30
	Mão-de-obra ¹	0,08	0,19
	Total	1,52	3,49
Pododermatite	Medicamentos	1,19	2,73
	Mão-de-obra ²	0,71	1,64
	Total	1,90	4,37
Ectima contagioso	Medicamentos	0,12	0,27
	Mão-de-obra ³	0,21	0,47
	Total	0,32	0,74
Ceratoconjuntivite	Medicamentos	1,82	4,19
	Mão-de-obra ⁴	0,41	0,93
	Total	2,23	5,12
Eimeriose	Medicamentos	5,61	12,91
	Mão-de-obra ⁵	0,61	1,39
	Total	8,11	14,30
Ectoparasitas	Medicamentos	0,03	0,06
	Mão-de-obra ⁶	0,14	0,31
	Total	0,16	0,37
Mamite	Medicamentos	3,24	7,44
	Mão-de-obra ⁷	0,51	1,16
	Total	3,74	8,60

* Valor em dólar (junho de 1999) atualizado para real (abril de 2002).

¹ Drenagem do material caseoso e troca do dreno após 24 horas.

² Considerando a média de peso vivo = 30 kg/animal (15 min./dia x 7 dias).

³ Aplicação de iodo: 5 min./aplicação x 2 vezes/dia x 3 dias = 30 min.

⁴ Medicamento - 2 vezes/dia x 6 dias = 60 min.

⁵ Medicamento - (2 vezes/dia x 7 dias) (30 min./dia x 3 dias) = 90 min.

⁶ Pulverização 10 min./animal x 2 banhos = 20 min.

⁷ Ordenha + aplicação de compressa quente: 15 min./dia x 5 dias = 75 min.

Fonte: Embrapa Caprinos.

Segundo Silva (1996), que analisou o sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil, o problema sanitário de maior relevância ainda é a verminose, seguida da artrite encefalite caprina (CAE).

Na tabela 2, estão apresentados dados sobre enfermidades e sinais clínicos que acometem rebanhos caprinos, conforme informações dos proprietários, a partir de um levantamento realizado em 127 propriedades no Estado do Ceará. Um estudo semelhante foi realizado no semi-árido mineiro (Tabela 3), em rebanhos caprino e ovino compostos, principalmente, pelo tipo racial SRD e mestiços.

Tabela 2. Enfermidades e sinais clínicos que acometem os rebanhos caprinos no Estado do Ceará.

Enfermidades / Sinais Clínicos	Presença		Ausência		Não sabe informar	
	Número	%	Número	%	Número	%
Helmintoses	104	81,9	19	15,0	4	3,2
Diarréias	100	78,7	24	18,9	3	2,7
Aborto	96	75,6	26	20,5	5	3,9
Pododermatite	86	67,7	35	27,6	6	4,7
Linfadenite Caseosa	85	66,9	37	29,1	5	3,9
Ectoparasitoses	81	63,8	42	33,1	4	3,2
Mamite	65	51,2	56	44,1	6	4,7
Pneumonia	57	44,9	65	51,2	5	3,9
Ectima Contagioso	42	33,1	80	63,0	5	3,9
Ceratoconjuntivite	37	29,1	85	67,0	5	3,9
Sintomatologia Nervosa	33	26,0	89	70,1	5	3,9
Malformação Fetal	19	15,0	103	81,1	5	3,9
Criptorquidismo	14	11,0	108	85,0	5	3,9
Prolapso de Vagina/Útero	14	11,0	108	85,0	5	3,9
Artrite	11	8,7	110	86,6	6	4,7
Febre Aftosa	3	2,4	119	93,7	5	3,9
Raiva	1	0,8	121	95,3	5	3,9

Fonte: Pinheiro (2001).

Tabela 3. Enfermidades e sinais clínicos nos rebanhos pesquisados no Norte de Minas Gerais.

<i>Enfermidades /Sinais Clínicos</i>	<i>Presença</i>	
	<i>Número</i>	<i>%</i>
Linfadenite Caseosa	100	47,9
Aborto	86	41,2
Ectoparasitoses	63	30,0
Diarréias	56	26,8
Ectima Contagioso	44	21,0
Mamite	33	15,8
Ceratoconjuntivite	31	15,8
Pododermatite	26	12,4
Pneumonia	26	12,4

Fonte: Yorinori (2001).

Métodos de diagnóstico

O diagnóstico das doenças em animais pode ser realizado por meio de dois procedimentos: o método clínico e o método epidemiológico. As etapas nos dois métodos são muito semelhantes. O método clínico aplica-se no indivíduo, enquanto o método epidemiológico, mais abrangente, se aplica ao rebanho ou à região produtiva, indicando as possíveis causas e fatores de risco envolvidos no problema e suas medidas de controle. Na Tabela 4, estão relacionadas as características de cada método.

Tabela 4. Características dos métodos de diagnóstico.

<i>Etapas</i>	<i>Características dos Métodos de Diagnóstico</i>	
	<i>Clínico</i>	<i>Epidemiológico</i>
Base da informação	Animal doente ou são	Rebanho doente ou são
Coleta de informações	História clínica e dados individuais	Dados da área afetada da ambiência
Tipo de exame	Exame físico geral e especial	Inspeção da área em geral e particular a determinados serviços
Hipótese	Diagnóstico clínico	Hipótese epidemiológica
Medidas temporárias	Tratamento inicial	Recomendações gerais
Laboratório	Exame de amostras corporais (Sangue, urina, etc)	Exame de água, alimentos e outras amostras
Diagnóstico	Diagnóstico definitivo	Diagnóstico epidemiológico
Medidas definitivas	Tratamento definitivo	Medidas de controle
Registro da ação efetuada	História clínica	Ficha epidemiológica; Informe

Fonte: Côrtes (1993).

Os métodos de diagnóstico laboratoriais tiveram o seu início no século XIX, através dos estudos de Pasteur com testes de aglutinação e evoluíram com os avanços da imunologia e da biologia. Atualmente, um dos maiores desafios da ciência moderna e da medicina veterinária é a aplicação dos avanços básicos da imunobiologia, da imunoquímica e da biologia molecular, no diagnóstico e procedimentos terapêuticos úteis.

Nas duas últimas décadas, as técnicas laboratoriais nas áreas de imunologia e biologia têm se tornado cada vez mais refinadas, precisas e simples. Por causa de suas inerentes sensibilidade e especificidade, estes métodos têm agora um papel central nos modernos laboratórios de ciência.

O diagnóstico precoce tem como objetivo melhorar a disponibilidade, a acurácia e a precisão, além de disponibilizar resultados com maior rapidez, assegurando uma correta interpretação.

Diagnóstico precoce

O diagnóstico precoce refere à detecção de uma enfermidade o mais rápido possível, podendo utilizar ferramentas clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. O diagnóstico precoce ideal caracteriza-se por ser rápido, prático e seguro, ter baixo custo, apresentar alta sensibilidade e especificidade, e necessitar de poucos equipamentos e infra-estrutura.

As vantagens do diagnóstico precoce são: rapidez, fácil leitura, segurança e controle mais eficiente das enfermidades. As suas desvantagens são: geralmente mais caro, necessita freqüentemente de equipamento, área laboratorial e de pessoal qualificado e treinado.

A importância do diagnóstico precoce para os pequenos ruminantes é ressaltada pelo reconhecimento de animais antes da fase clínica da enfermidade, pela retirada rápida de animais enfermos do rebanho, pelo menor número de animais expostos à contaminação, redução dos gastos com tratamentos, com sacrifício ou abate de animais, perdas na produção (carne/leite/pele), ter controle mais eficiente das enfermidades, incremento na exportação de produtos, barreira sanitária mais eficiente e facilidade no manejo sanitário.

O diagnóstico precoce pode ser utilizado quando são necessárias resposta e ação rápida e efetiva, tais como: importação de animais ou material biológico que ficarão em quarentena, Vigilância Sanitária, trânsito de animais no país, fases avançadas de programas de controle de enfermidade, programas de erradicação de enfermidades e diagnóstico de enfermidade de animais de alto valor genético.

Métodos de diagnóstico precoce

O diagnóstico precoce na área epidemiológica pode ser traduzido por uma constante análise dos dados da vigilância sanitária e baseados nestes na implantação de medidas que evitem a disseminação de uma ou várias enfermidades, bem como na montagem de programas de controle, e de erradicação de doenças.

Com relação aos métodos laboratoriais, atualmente diversas técnicas imunológicas e de biologia molecular podem ser aplicadas para obtenção de uma resposta rápida, prática e segura. Algumas técnicas mais importantes para o diagnóstico das principais enfermidades dos pequenos ruminantes são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Técnicas de diagnóstico precoce das principais enfermidades dos pequenos ruminantes, utilizados no Brasil.

<i>Enfermidades</i>	<i>Testes padronizados</i>
Brucelose	ELISA ¹ , PCR ¹
CAE	ELISA ² , <i>Dot Blot</i> ² , PCR ³ , Imunofluorescência ²
Febre Aftosa	ELISA ⁴ , PCR ⁴
Linfadenite Caseosa	ELISA ⁵ , <i>Dot Blot</i> ⁶
Língua Azul	ELISA ⁷ , PCR ⁷
Micoplasmose	PCR ⁸ , Imunofluorescência ⁸ , ELISA ⁹
Raiva	ELISA ¹⁰ , PCR ¹¹ , <i>Dot Blot</i> ¹²
Toxoplasmose	ELISA ¹³ , PCR ¹³

¹ Garin-Bastuji (2000); ²Pinheiro et al. (2001); ³Andrioli (2001); ⁴Reid et al. (1998);

⁵Alves (1988); ⁶Vaiseh (1990); ⁷Billinis et al. (2001); ⁸Bajmocy et al. (2000);

⁹Thiaucourt et al. (1996); ¹⁰Esterhuysen et al. (1995); ¹¹Ito et al. (2001);

¹²Jayakumar et al. (1996); ¹³Esteban Redondo & Innes (1998).

Dentre os métodos de diagnóstico precoce laboratorial destacam-se os:

Métodos Diretos

Estes métodos detectam o próprio agente (bactérias, vírus, fungos, parasitas, e outros agentes) ou fragmentos do seu material nucléico (DNA ou RNA).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

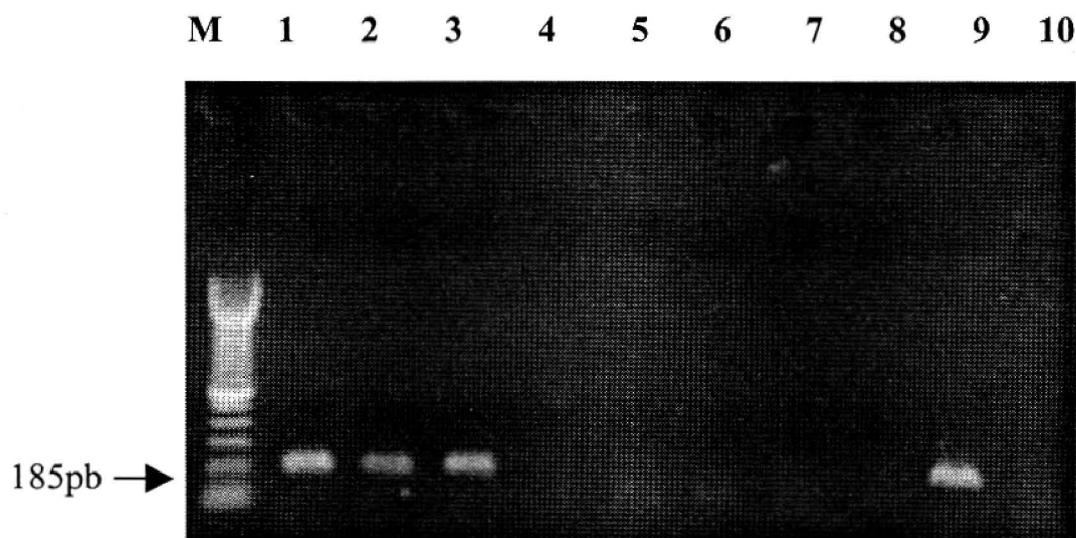
Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80. Esta técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA presentes no material analisado, amplificando-o em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob estado de latência, integrados ao genoma do hospedeiro ou, ainda, microrganismos mortos, podem ser detectados por este método. A amplificação *in vitro* dos ácidos nucléicos permite a obtenção de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA. Desta forma, a PCR vem sendo adotada mundialmente na pesquisa de microrganismos devido à sensibilidade, especificidade e rapidez de seus resultados. É possível detectar o DNA proviral de vírus um dia após a infecção dos cultivos celulares, e de apenas uma célula infectada em um cultivo de 10^6 células, sendo a técnica mais eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença.

Existem vários tipos de PCR, tais como: PCR *Nested*, PCR *duplo-Nested*, RT-PCR, dentre outros.

A PCR *Nested* ou a PCR *duplo Nested* aumenta maior sensibilidade, quando comparada à PCR simples, enquanto que a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos. Porém, estas técnicas são mais onerosas e trabalhosas, além de apresentar, no caso da PCR *Nested*, grande risco de contaminação do laboratório com DNA amplificado, levando a ocorrência de falsos positivos. Quanto ao RT-PCR, é uma técnica utilizada, principalmente, para a detecção de enfermidades causadas por vírus RNA.

A técnica da PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA-proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras, como: sangue, líquido

sinovial, leite e soro do leite, tecidos, sêmen, fluidos uterinos e embrião (Figura 1). No caso especificamente dos lentivírus dos pequenos ruminantes (LVPR), é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso. Porém, parece não haver relação entre o título de anticorpos e o aparecimento de bandas positivas à PCR no sangue, e nem todas as amostras positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR.



Fonte: Andrioli (2001).

Fig. 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PCR *Nested* de amostras de sêmen de bodes infectados naturalmente com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M marcador DNA Ladder; 1, 2 e 3 - amostras positivas; 4, 5, 6, 7 e 8 - amostras negativas; 9 - controle positivo e 10 - controle negativo.

A PCR poderá ser utilizada em programas de erradicação, identificando os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que esta técnica seja mais empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos.

Hibridização *in situ* (HIS)

Esta técnica é muito sensível e consiste na identificação de segmentos específicos de ácido nucléico, encontrados em tecidos ou células infectadas, capazes de serem detectados por sondas de DNA marcadas por enzimas ou por radioatividade. É de uso limitado, em decorrência de ser laboriosa e dispendiosa para ser utilizada em rotina de diagnóstico. Entretanto, pode ser utilizada para dirimir resultados duvidosos.

Ensaio Imunoenzimáticos

Os testes imunoenzimáticos para detecção de antígenos são, também, formas de diagnóstico direto do agente. Estes testes necessitam de anticorpos marcados com enzimas contra os agentes causais, o que muitas vezes exigem anticorpos monoclonais, específicos para cada agente infeccioso.

Métodos indiretos

Os métodos de diagnóstico indireto se caracterizam pela detecção de anticorpo anti-agente ou agente causal. A sorologia para detecção de enfermidades é uma forma funcional de diagnóstico, podendo ser realizada através de técnicas como: imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) indireto, *Dot-Blot* e *immunoblotting*. Na Tabela 6, encontra-se a sensibilidade relativa de vários ensaios.

Tabela 6. Sensibilidade relativa de ensaios para antígenos e anticorpos.

<i>Técnica</i>	<i>Sensibilidade aproximada(/dL)</i>
Dosagem de proteína (Biureto / refratometria)	100 mg
Imunoeletroforese	5-10 mg
Imunofixação	5-10 mg
Imunodifusão simples	< 1-2 mg
IDGA	< 1 mg
Contra-imunoeletroforese	< 100µg
Fixação de complemento	1 µg
Aglutinação	1 µg
Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI)	1 µg
Ensaio imunoenzimático (ELISA)	< 1µg
<i>Dot-Blot</i>	< 1µg
ELISA com sistema de amplificação (Biotina/avidina e Quiluminescência)	< 1pg
Imunofluorescência	< 1pg
Radioimunoensaio	< 1pg

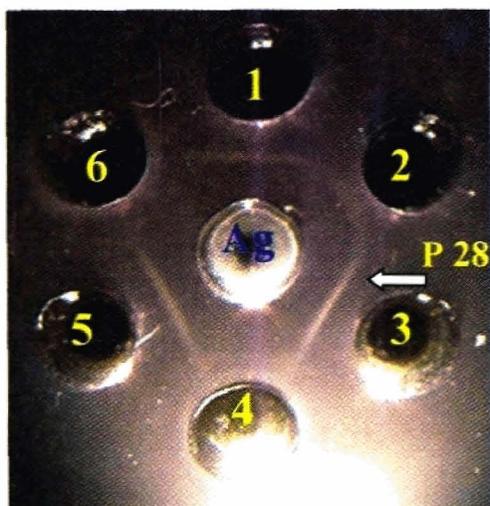
Fonte: Adaptado de Stites et al. (1995).

Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA)

Devido à praticidade na coleta das amostras e ao baixo custo/benefício, a detecção de anticorpos é amplamente utilizada, sendo a IDGA recomendada para o diagnóstico inicial num rebanho ou numa região onde seja desconhecida a prevalência de enfermidades. Este teste é recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico de infecção por lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR). O teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony fundamenta-se na difusão de anticorpo e antígeno em uma base semi-sólida contendo ágar e eletrólitos. Quando antígeno e anticorpo se encontram em concentrações equivalentes interagem e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação.

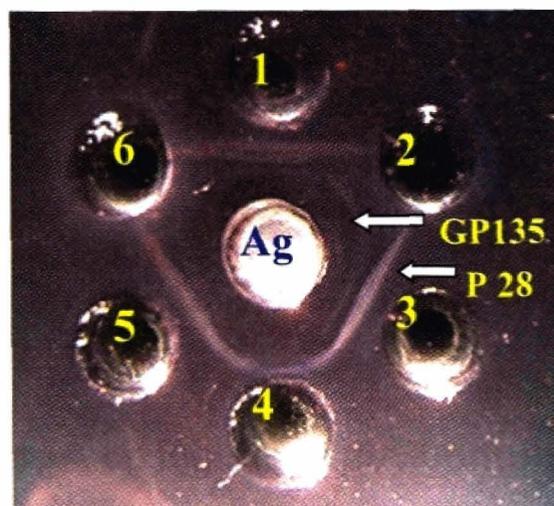
O teste de microimunodifusão (MIDGA) é uma variante do IDGA, no qual se reduz a quantidade de antígeno e soros necessários e, conseqüentemente, os custos. O MIDGA mais utilizado é o hexagonal, por apresentar melhores resultados, dado que a amostra de soro a ser testada fica posicionada entre dois padrões positivos, facilitando a leitura do resultado.

No caso dos LVPR, as proteínas gp135 (glicoproteína) e p28 (proteína núcleo-capsídeo) (Figura 2 e 3) são as responsáveis pelas linhas de precipitação observadas no teste de IDGA, sendo que o antígeno gp135 detecta maior número de caprinos infectados do que o antígeno p28, ainda que alguns animais desenvolvam resposta anti-p28 na ausência de resposta anti-gp135. Salienta-se, portanto, a importância da escolha dos soros de referência utilizados em testes IDGA, para diagnóstico de infecção por LVPR.



Fonte: Pinheiro et al. (2001).

Fig. 2. MIDGA realizado com antígeno (Ag) de CAEV com a proteína p28. Os poços 1, 3 e 5 possuem soro reagente. O poço 2 soro positivo, o poço 4 soro negativo e o poço 6 soro fraco positivo.



Fonte: Pinheiro et al. (2001).

Fig. 3. MIDGA realizado com antígeno (Ag) de CAEV com as proteínas p28 e gp135. Os poços 1, 3 e 5 possuem soro reagente para as duas proteínas. Os poços 2 e 6 soro negativo para p28 e positivo para gp135. O poço 4 soro positivo para as duas proteínas.

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As reações de imunofluorescência indireta possibilitam a visualização da interação antígeno/anticorpo, através de uma anti-imunoglobulina com fluorocromos. Estas substâncias são capazes de absorver energia luminosa tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo. Tais substâncias passam a liberar a energia na forma de fluorescência. Os fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina (fluorescência vermelha) e o isotiocianato de fluoresceína (fluorescência verde).

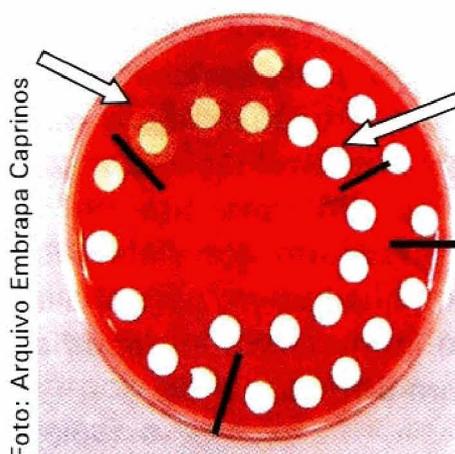
Esta técnica pode ser usada para detectar e titular anticorpos, como também, identificar e localizar antígenos. Comparando os testes IDGA e ELISA com o teste descrito de RIFI, na pesquisa de anticorpos contra o Lentivírus ovino vírus da Maedi-Visna (MVV), foi verificado que a RIFI e a IDGA apresentaram concordância de 94%. Utilizada como referência em outras retroviroses, como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a RIFI chega a 100% de concordância entre o ELISA e *Immunoblotting*. É também considerada como uma técnica de eleição para o diagnóstico da toxoplasmose.

Apesar da técnica apresentar uma boa sensibilidade e ser relativamente de baixo custo, é necessário um treinamento específico do técnico, principalmente com relação à leitura dos resultados.

Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI)

Este teste é uma das provas de rotina para detecção de anticorpos contra a toxina da bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Linfadenite Caseosa). É um teste que, através da inibição ou não da hemólise em placa de petri contendo toxina do *Rhodococcus equi*, pode-se determinar a quantidade de anticorpos contra o agente (Figura 4). É uma prova de custo relativo alto e boa aplicabilidade. Apresenta sensibilidade e especificidade compatíveis em parte com o ELISA e o *Dot-Blot*.

Negativo (título 1:8, 1:16 e 1:32)



Positivo (título 1:2 e 1:4)

Fig. 4. Teste de Inibição da Hemólise Sinérgica (SHI) em cinco amostras de soro ovino em cinco diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32).

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) se baseia na utilização de antígenos ou de anticorpos marcados com enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividades tanto imunológica como enzimática. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e insolubilizado sobre um suporte (placa), a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e poderá, facilmente, ser revelada mediante a adição de um substrato específico que, sob ação da enzima, produzirá uma cor vista a olho nu e quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro.

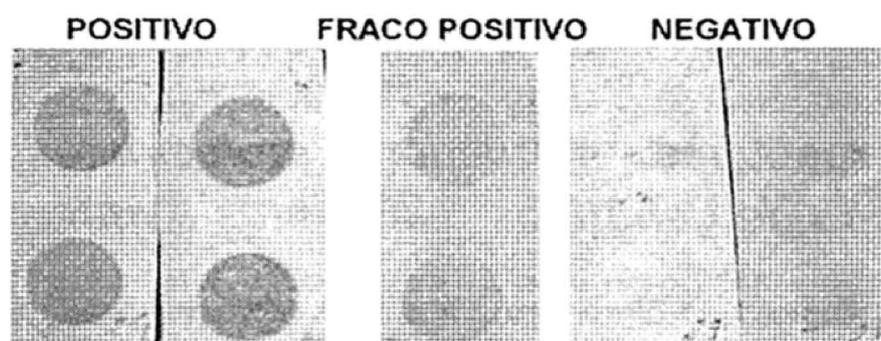
Diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos em enfermidades de pequenos ruminantes, onde são empregados tanto antígenos naturais como recombinantes. De acordo com o antígeno e a técnica do ELISA empregados (direto, indireto, sanduíche de competição, etc), existe uma grande variação de sensibilidade e especificidade. Apesar disto, esta técnica, de uma maneira geral, apresenta boa sensibilidade e mantém alta a especificidade, sendo, portanto, indicada na utilização de diagnóstico precoce, programas de controle e de erradicação de enfermidades.

Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-immunoblotting)

O *Dot-immunoblotting* (DB) pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras, ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. As amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose coberta com anticorpos e analisadas por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada como um método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do immunoblotting após a transferência do antígeno para a membrana (Figura 5).

Para o diagnóstico da CAE, o DB é um teste com boa resolução e baixa reação inespecífica sendo mais viável que a IDGA e o ELISA indireto, pois além de ser mais sensível que a IDGA, não necessita da instrumentação tecnológica do ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e,

conseqüentemente, mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões) ou até mesmo no campo.



Fonte: Pinheiro et al. (2001).

Fig. 5. *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico de CAE de um *pool* de soros positivos, fracos positivos e negativos, testados pelo IDGA.

Immunoblotting* ou *Western blotting

Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa, ela vem sendo utilizada somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas antigênicas. Mas, com o desenvolvimento de novos aparelhos que multiplicam a quantidade de testes (*immunoblotting*), será mais um método de diagnóstico precoce de altíssima sensibilidade. Na sua execução, o material protéico viral é separado por eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Na membrana, 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. O *immunoblotting* detecta anticorpos, dependendo da infecção, já aos 4 dias pós-infecção, enquanto no ELISA indireto os anticorpos são detectados somente 15 a 20 dias pós-infecção. Comprova-se, assim, a alta sensibilidade do *immunoblotting* para detecção precoce de anticorpos para o vírus da CAE. É considerado, portanto, como teste de excelência.

Com relação ao custo de cada prova, Reischak (2000) verificou que o teste de imunofluorescência indireta (US\$ 1,72) é mais barato que o IDGA (US\$ 2,48), entretanto o autor não detalhou o custo. Pinheiro (2001), com

uma análise detalhada dos custos de produção do antígeno e dos testes, verificou que o teste MIDGA custava US\$ 0,67, enquanto que o *Dot Blot* custava US\$ 1,00 e o ELISA US\$ 1,22. Provavelmente, a diferença do custo entre os dois autores possa ser explicada, em parte, devido à variação da quantidade de material utilizada entre as duas técnicas (IDGA X MIDGA).

Perspectivas - marcadores moleculares para detecção de genótipos resistentes a enfermidades

As novas técnicas de biotecnologia aliadas às metodologias tradicionais deverão aumentar ainda mais a produção animal que vem sendo observada com os pequenos ruminantes. O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permite que animais mais resistentes às enfermidades infecciosas e aos distúrbios metabólicos se tornem mais produtivos e precoces.

É interessante lembrar que os animais da mesma espécie possuem o mesmo grupo de genes, ou seja, as informações para síntese de proteína, produção de anticorpos, hormônios, dentre outros. Por que, então, há diferenças em resistência à doença entre animais da mesma espécie? Essas diferenças são resultantes de pequenas mudanças que ocorrem nas seqüências de nucleotídeos (DNA), que constituem a informação genética do animal.

Atualmente, o estudo de marcadores moleculares para detecção de enfermidades está mais desenvolvido na espécie bovina, entretanto, é uma ferramenta importante que pode ser utilizada para associar genes/marcadores à característica de resistência à helmintose, dentre outras enfermidades. Trabalhos de pesquisa têm demonstrado a associação entre polimorfismo genético e resistência à helmintose em ovinos. Ressalta-se que até o momento não existem estudos de marcadores genéticos associados à resistência à infecção parasitária em caprinos.

Portanto, num futuro próximo, o uso de marcadores moleculares para selecionar pequenos ruminantes resistentes às enfermidades possibilitará um incremento substancial na produção destas espécies.

Considerações Finais

A estabilidade dos sistemas produtivos sustentáveis passa pelo uso adequado de tecnologias, manejos eficientes e detecção precoce de problemas. A caprino-ovinocultura no Nordeste é um exemplo destes, pois, através do seu crescimento e modernização, favorece um desenvolvimento mais harmônico, socialmente justo e sustentável.

Os avanços nos métodos de prevenção e controle das enfermidades demandam pesquisas nas áreas tecnológicas e científicas em medicina veterinária. Em consequência desses avanços no processo de produção e melhoria na sanidade animal, cita-se o diagnóstico precoce, que auxilia a obtenção de animais mais saudáveis, produtos de qualidade e incremento na pauta de exportação.

Referências Bibliográficas

ALVES, F. S. F. **Immunokinetics of goats with *C. ovis* vaccination and infection.** 1988. 68f. Thesis (Master of Science). Davis: University of California, 1988.

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 2001. 68f. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária.

GARIN-BASTUJI, B. **Brucellosis in sheep and goat: advances in diagnosis, prevention and control.** In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7., 2000., Tours, France. **Proceedings...** France: INRA, 2002. v.1. p. 267-272.

BAJMOCY, E.; TURCSANYI, I.; BOLSKE G.; BACSADI, A.; KISS, I. **Disease caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies mycoides LC in Hungary goat herds.** **Acta Veterinaria Hungarica**, Hungary, v. 48, n. 3, p. 277-283, 2000.

BILLINIS C.; KOUMBATI M.; SPYROU, V.; NOMIKOU, K.; MANGANA, O.; PANAGIOTIDIS, C. A.; PAPADOPOULOS, O. **Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription - PCR: a comparasion with**

conventional methods. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 77-89, 2001.

CÔRTEZ, J.A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Varela, 1993. 227p.

ESTEBAN-REDONDO, I.; INNES, E. A. Detection of *Toxoplasma gondii* in tissues of sheep orally challenged with different doses of oocysts. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 9, n. 28, p.1459-1466, 1998.

ESTERHUYSEN, J. J.; PREHAUD, C.; THOMSON, G. R. A liquid-phase blocking ELISA for the detection of antibodies to rabies virus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p.31-42, 1995.

JAYAKUMAR, R.; THIRUMURUGAN, G.; NACHIMUTHU, K.; PADMANABAN, V. D. Detection of rabies virus antigen in animals by avidin-biotin dot ELISA. **Zentralbl. Bakteriol.**, v. 285, n. 1, p.82-85, 1996.

ITO, M., ITOU, T.; SAKAI, T.; SANTOS, M. F.; ARAI, Y.T.; TAKASAKI, T.; KURANE, I.; ITO, F.H. Detection of rabies virus RNA isolated from several species of animals in Brazil by RT-PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 63, n. 12, p. 1309-1313, 2001.

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, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 2001. 115p. Tese (Doutorado).

PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G. **Métodos de diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2001. (Embrapa Caprinos, Circular Técnica, 24).

REID, S. M.; FORSYTH, M. A.; HUTCHING, G. H.; FERRIS, N. P. Comparison of reverse transcription polymerase chain reaction, enzyme linked immunosorbent assay and virus isolation for the routine diagnosis of foot-and-mouth disease. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 70, n. 2, p. 213-217, 1998.

REISCHAK, D. **Lentivírus de pequenos ruminantes: imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos e caprinos.** 2002. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, R. R. **Sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil.** Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1996. 38p. (Monografia, Especialização em Agribusiness).

STITES, D. P.; RODGERS, R.P.C. Clinical laboratory methods for detection of antigens & antibodies. In: STITES, D.P.; STOBO, J. D.; WELLS, J. V. (Ed.). **Basic & clinical immunology.** 6.th ed. New York: Lange Medical Book, 1995. p.241-284.

THIAUCOURT, F.; BOLSKE, G.; LENEGUERSH, B.; SMITH, D.; WESONGA, H. Diagnosis and control of contagious caprine pleuropneumonia. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v.15, n. 4, p. 1415-1429, 1996.

YORINORI, E.H. **Região mineira do Nordeste: características dos sistemas de produção de pequenos ruminantes domésticos e prevalências da Artrite-encefalite caprina (CAE) e Maedi-Visna (MV) ovina,** Minas Gerais 2000. 114f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

VAISEH, F. P. **Development of a Dot Blot assay for sero-diagnosis of caseous lymphadenitis using a purified exotoxin as antigen.** 1990. 65f. Dissertation (Doctor of Philosophy Thesis) - University of California, Davis: University of California.