

IMUNOPEROXIDASE PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

CASTRO, Clarissa Caetano de¹; FÁCCIO, Cacciane²; MEDEIROS, Daiane²; SILVA, Luis Gustavo Crochemore da Silva²; FINGER, Paula Fonseca¹; SIEDLER, Bianca Sica¹; HÜBNER, Sílvia de Oliveira³.

¹ Mestranda do PPGV – Departamento de Veterinária Preventiva – Laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária – UFPel

² Graduando em Medicina Veterinária – Bolsista CNPq – Laboratório de Virologia Veterinária – UFPel

³ Professora Adjunta – Departamento de Veterinária Preventiva – Laboratório de Virologia Veterinária – UFPel

cacamedvet@bol.com.br

1 INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é causada pelo agente *Bovine Leukemia Virus* (VLB), um vírus RNA que pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* (OLIVEIRA; MACHADO; KROLI, 2000). É considerada uma enfermidade de distribuição mundial, com exceção de alguns países europeus que erradicaram a doença a partir da década de 1980. No Brasil, a infecção está amplamente difundida, com níveis variáveis de prevalência entre os rebanhos, apresentando maior predomínio em gado leiteiro (RAVAZZOLO; DA COSTA, 2007).

O VLB é um agente etiológico de duas manifestações clínicas distintas em bovinos: linfocitose persistente (LP), de caráter benigno, e a forma multicêntrica enzoótica de linfossarcoma de animais adultos, que é neoplasia maligna mais comum em gado leiteiro (MORAES et al, 1996). Segundo FERRER (1979), em torno de 30% dos animais infectados pelo VLB desenvolvem LP, enquanto a ocorrência de linfossarcoma raramente ultrapassa os 5%. Além disso, a infecção pelo VLB pode comprometer o sistema imunológico dos bovinos ocasionando, indiretamente, redução na produtividade. Devido à imunossupressão, e conseqüente ocorrência de infecções secundárias, os animais infectados podem ser descartados precocemente antes mesmo do aparecimento de qualquer sinal clínico relacionado com a LEB. Em rebanhos infectados com o VLB, quando comparados com rebanhos livres, a produção de leite é menor e a taxa de descarte é maior. Estes fatores aumentam os prejuízos econômicos determinados por esta virose para a pecuária bovina (TRAININ et al., 1996).

O diagnóstico da LEB é realizado pelo exame clínico associado a exame histológico e/ou sorológico, que permite a identificação de anticorpos específicos contra os antígenos do VLB. A interpretação dos resultados sorológicos baseia-se no conhecimento de que o animal com infecção pelo VLB permanece portador do vírus por toda a vida, e conseqüentemente, será sempre soropositivo (EVERMANN, 1992).

O primeiro teste sorológico desenvolvido e empregado para diagnosticar a infecção pelo VLB foi à prova de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), que continua sendo o teste padrão aprovado pelo Ministério da Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde Animal (OIE). Este teste apresenta como problemática um longo tempo para a leitura do resultado (72 horas), as reações inespecíficas e a sensibilidade baixa, pois quando um animal tem níveis baixos de anticorpos estes podem não ser detectados (FLORES, 2007). O ensaio imunoenzimático (ELISA) também é utilizado como prova padrão para diagnóstico, apresenta boa sensibilidade e rapidez na sua execução, porém possui um custo relativamente alto, em comparação ao IDGA, além de que há necessidade de importação. A literatura

cita a utilização de outros testes para realização do diagnóstico, como radioimunoensaio (RIA) e reação de polimerase em cadeia (PCR).

O presente trabalho pretende avaliar o uso da técnica de Imunoperoxidase (IPX) para diagnóstico de LEB. A IPX é um teste rápido, de fácil execução, de custo menos elevado e de maior praticidade para obtenção dos resultados, quando comparado com o teste de IDGA, o que permite que um maior número de amostras seja testado simultaneamente.

2 METODOLOGIA

Células *Fetal Lamb Kidney* (FLK) naturalmente infectadas pelo VLB foram cultivadas em placa de poliestireno contendo 96 cavidades, contendo meio essencial mínimo com sais de Earle (MEM; Invitrogen) e 10 % de soro fetal bovino (Invitrogen). Após 48 horas o MEM foi desprezado e a placa seca a 37° C. Em seguida, as células foram fixadas pela adição de 100 µl/cavidade de uma solução de paraformaldeído a 4%, por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi efetuada lavagem com solução salina tamponada contendo Tween 80 (PBS T80) para remoção do excesso do fixador, por quatro vezes. A seguir foram adicionadas amostras conhecidas, soros positivos e negativos, provenientes de animais previamente testados pela técnica de IDGA. Os soros controles positivos e negativos foram testados pela IPX em diferentes diluições (1:10; 1:20; 1:40 e 1:80) e em duplicata. As amostras foram incubadas “overnight” a 37° C em câmara úmida (100 µl/cavidade). Na sequência, após quatro lavagens com PBS T80, foi adicionado 50 µl/cavidade do conjugado anti-IgG bovino com peroxidase (Sigma) na diluição 1:300. Após uma hora de incubação em estufa a 37° C, a placa foi lavada quatro vezes com PBS T80, e adicionado 50 µl/cavidade da solução reveladora (5 ml de tampão acetato pH 5.0, 200 µl de solução de carbazol e 10 µl de H₂O₂). Após 15 minutos a 37° C foi procedida à leitura em microscópio ótico invertido, visando à observação da formação de coloração carmim, nos locais onde houve reação imune.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teste de IPX realizado conforme descrito permitiu a detecção dos animais positivos para LEB e não apresentou reação com as amostras negativas analisadas. Contudo, tais resultados foram equivalentes aos apresentados pela prova de IDGA somente na diluição 1:10.

A identidade de resultados, nas amostras de soros testadas, entre a técnica de IPX desenvolvida neste estudo e o teste de IDGA, indica a possibilidade de utilização da técnica de IPX para diagnosticar animais positivos para LEB. O trabalho de BUZAŁA e DEREÑ (2003) demonstra que a IPX apresenta maior especificidade e sensibilidade quando comparada aos testes de IDGA e ELISA.

Outrossim, é necessário a realização de mais testes para otimizar a padronização da técnica de IPX, aumentando-se a amostragem e efetuando-se análises estatísticas dos dados obtidos. A confirmação do uso da IPX para diagnóstico de LEB permitirá a análise de um maior número de amostras de soro, em um menor tempo e com um custo mais baixo, quando comparado ao teste padrão atual (IDGA).

4 CONCLUSÃO

Os resultados preliminares indicam a possibilidade do uso da técnica de IPX para diagnosticar animais soropositivos e soronegativos para Leucose Enzoótica Bovina.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUZAŁA E, DERENÍ W. Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leukosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 6, n. 3, p. 9-11, 2003.
- EVERMANN, J. F. A look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. Symposium on bovine leukemia virus infection. **Veterinary Medicine**., n. 3, p. 272-278, 1992.
- FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. **Journal of American Veterinary Medical Association**. Chicago, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.
- FLORES, E. F. Diagnóstico Laboratorial das Infecções Víricas. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria. Ed: UFSM, 2007, cap. 11, p. 295-326.
- MORAES, M. P. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996.
- OLIVEIRA, A.R.; MACHADO, P.E.A.; L.B.; KROLI et al. Leucose bovina: caracterização do proteinograma eletroforético em dois rebanhos identificados como soropositivos e com linfocitose persistente. **Arquivos: Instituto biológico**. São Paulo, v. 67, n. 1, jan./jun. 2000. Disponível na Internet: http://www.biologico.br/arquivos/v67_1/leucose_bovina.htm. Acesso em 19 de agosto de 2010.
- RAVAZZOLO, A. P.; DA COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria. Ed: UFSM, 2007, cap. 31, p. 819-823.
- TRAININ, Z. et al. Detrimental effect of bovine leukemia virus (VLB) on the immunological state of cattle. **Veterinary Immunology Immunopathology**. , v. 54, n. 1-4, p. 293-302, 1996.