

Padronização do Elisa indireto e *Western Blot* para diagnóstico da artrite-encefalite caprina

[Standardization of indirect Elisa and Western Blot for diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis]

A.S. Rodrigues¹, R.L.L. Brito², R.R. Pinheiro³, R.P. Dias¹, S.M. Alves⁴, T.S. Souza⁵, K.C. Souza¹, D.A.A. Azevedo⁴, A. Andrioli³, D.C.T. Magalhães⁶, M.F.S. Teixeira^{1*}

¹Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza, CE

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal, SP

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, CE

⁴Universidade Estadual Vale do Acaraú – Sobral, CE

⁵Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia – Salvador, BA

⁶Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará – ADAGRI – Sobral, CE

RESUMO

A artrite-encefalite caprina (CAE) é diagnosticada rotineiramente pela técnica de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), que é considerada pouco sensível. Objetivou-se com este estudo padronizar testes de Elisa-i e *Western Blot* (WB) para diagnóstico precoce de anticorpos em caprinos contra CAEV e comparar os resultados obtidos nesses testes com a prova de IDGA. Para a padronização dos testes Elisa-i e WB, utilizaram-se diferentes concentrações e diluições de antígeno, soros e conjugado. No Elisa-i, adotaram-se microplacas rígidas com 96 poços, sendo a combinação de concentração de 0,5µg/poço de antígeno e diluições de 1:100 de soro e 1:1500 de conjugado a que apresentou melhor resultado. No WB foram utilizadas membranas de nitrocelulose, definindo-se as diluições de 1:50 de soro e 1:15000 de conjugado. Para avaliar o desempenho das técnicas, 222 amostras de soro caprino foram testadas e os dados obtidos foram comparados com o IDGA. A sensibilidade e a especificidade do Elisa-i/IDGA, WB/IDGA e WB/Elisa-i foram de 70% e 91%, 100% e 72,6%, 84,6% e 76,5%, concomitantemente. O índice Kappa desses testes foi de 0,35, 0,2 e 0,36, respectivamente. As técnicas de Elisa-i e WB apresentaram-se mais sensíveis que a IDGA, podendo ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico precoce da CAE.

Palavras-chave: especificidade, infecção, LVPR, sensibilidade, sorologia

ABSTRACT

Caprine arthritis-encephalitis (CAE) is routinely diagnosed with the Agarose Gel Immunodiffusion (AGID) technique, which is considered to have low sensitivity. The objective of this study was to standardize testing i-Elisa and Western Blot for early detection of antibodies against CAEV in goats and compare the results obtained in these tests with proof of AGID. For standardization of i-Elisa and WB, different concentrations and dilutions of antigen, sera and conjugate were used. In the i-Elisa, rigid microplate with 96 wells was adopted, and the combination that showed the best result was a concentration of 0.5µg/ well of antigen and dilutions of the serum of 1:100 and conjugate of 1:1500. In the WB nitrocellulose membranes were used, and the dilutions of the serum were defined at 1:50 and conjugate at 1:15000. To evaluate the performance of the techniques, 222 goat serum samples were tested and the data were compared with the AGID. The sensitivity and specificity of Elisa-i/IDGA, WB/AGID and WB/Elisa-i were 70% and 91%, 100% and 72.6%, 84.6% and 76.5%, concomitantly. The Kappa index of these tests was 0.35, 0.2 and 0.36, respectively. The i-Elisa and WB techniques were more sensitive than the AGID and can be used as tools for early diagnosis of CAE.

Keywords: infection, sensitivity, serology, specificity, SRLV

Recebido em 21 de outubro de 2012

Aceito em 1 de outubro de 2013

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: labovirfavetuece@uece.br

INTRODUÇÃO

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) infecta caprinos de qualquer raça, sexo e idade, possui extenso período de incubação e se enquadra no grupo dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), necessitando de vigilância epidemiológica constante devido à sua dispersão mundial (Franke, 1998).

A artrite-encefalite caprina (CAE) é considerada uma enfermidade multissistêmica crônica, incurável, com evolução clínica longa e progressiva. Os sinais clínicos são: artrite, com aumento do volume das articulações; pneumonia com dificuldade respiratória; encefalite com paresia e paralisia; e mastite indurativa com nodulações no úbere (Greenwood, 1995).

Para o diagnóstico dos LVPR, os métodos sorológicos são os mais empregados; entre eles podem-se citar o teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), o ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-i) e o *Western Blotting* (WB). Contudo, cada um dos métodos de diagnóstico apresenta vantagens e desvantagens. Para uma escolha mais acertada, portanto, deve ser analisado cada teste (De Andrés *et al.*, 2005). Segundo esses autores, tais métodos podem ser divididos em duas categorias: métodos de triagem (IDGA e Elisa) e método complementar (WB).

A técnica IDGA é a mais utilizada para o diagnóstico dos LVPR, baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo que se insolubilizam e se precipitam no gel, sob uma base rígida, onde se desenvolve a linha de precipitação visível entre os orifícios no ponto em que é alcançada a relação ótima entre antígeno e anticorpo. Possui fácil aplicabilidade e alta especificidade (Varea *et al.*, 2001). Como desvantagem, o teste somente detecta altos níveis de imunoglobulinas, o que permite a ocorrência de falso-negativos no rebanho (McConnell *et al.*, 1998).

O Elisa-i é usado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soropidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (Madrugá *et al.*, 2001). Permite o processamento de um grande número

de amostras, sendo considerado mais sensível que a IDGA. No entanto, apresenta desvantagens como o custo de produção e a necessidade da utilização de antígenos mais purificados do que os empregados no IDGA (Pinheiro *et al.*, 2010).

O WB baseia-se na formação de um complexo antígeno-anticorpo que é visualizado por meio da aplicação de um conjugado enzimático, ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação (Bjerrum e Heegaard, 1988). Apresenta como vantagem menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos (Zanoni *et al.*, 1989).

Objetivou-se com este estudo padronizar testes de Elisa-i e WB para diagnóstico precoce de anticorpos em caprinos contra CAEV e comparar os resultados obtidos nesses testes com a prova de IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a comparação dos resultados de detecção de anticorpos em caprinos contra CAEV, as técnicas de IDGA, Elisa-i e WB foram aplicadas utilizando-se 222 amostras de soro caprino provenientes de um rebanho leiteiro pertencente à Embrapa Caprinos e Ovinos, localizado no município de Sobral, numa região semiárida do sertão cearense. Este estudo seguiu as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA), de acordo com o protocolo de Nº 014.12.

O antígeno utilizado na técnica de IDGA foi o antígeno nacional, preparado conforme metodologia de Pinheiro *et al.* (2010), evidenciando a coreproteína p28. Para a execução dessa microtécnica, seguiu-se o protocolo de Gouveia *et al.* (2000), adaptado por Pinheiro (2001). Para a visualização das linhas de precipitação, a leitura foi realizada 48-72 horas, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a segunda leitura.

Para a produção de antígenos dos testes de Elisa-i e WB, foram utilizados cultivos secundários de membrana sinovial caprina (MSC). Garrafas roller (850cm²) foram cultivadas com MSC até 70 a 80% de confluência e inoculadas com a amostra padrão CAEV-Cork, com título de 10^{-5.3}

TCID₅₀/mL. Os sobrenadantes do cultivo celular foram submetidos a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 37°C para a lise celular e a liberação de partículas virais.

Na produção do antígeno para o Elisa-i, o sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 3.300g durante 30 minutos. O *pellet* de células foi ressuspenso em solução de PBS (0,05M fosfato de sódio; 0,15M NaCl; pH 7,4), na proporção de 1:10 do volume inicial, e em seguida foi tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS), a uma concentração final de 0,1% (v/v). O tratamento foi realizado durante 10 minutos, em temperatura ambiente, sob homogeneização. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000g durante 15 minutos, a 4°C (Torres *et al.*, 2009). A concentração da proteína total do antígeno foi determinada pelo método de Bradford (1976). Após esse procedimento, o antígeno foi mantido a -20°C.

No desenvolvimento da técnica Elisa-i, foram utilizadas microplacas rígidas com 96 poços (*Nunc immuno plate/ M9410 – 1CS*). O volume de soluções distribuído em todas as etapas foi de 100µL por poço. O antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e distribuído nos poços em diferentes concentrações: 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125µg/mL. A placa foi incubada por 60 minutos a 37°C e, posteriormente, ficou 18h sob refrigeração. Após esse processo de sensibilização, a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%, mais 0,05% de Tween 20). Em seguida, bloquearam-se os sítios livres com tampão PBS em caseína a 2% por 1 hora e 30 minutos a 37°C e, após esse período, a placa foi lavada duas vezes. Na primeira coluna da placa, foram distribuídos 100µL de tampão de incubação (TI) - PBS, 0,25% de caseína, mais 0,05% de Tween 20, correspondendo, assim, à coluna do branco.

Os soros controle positivo (rico nas proteínas do CAEV gp135 e p28), negativo e reagente (rico em gp 135) do *kit* de IDGA (Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA) foram diluídos em TI, em triplicata, nas proporções de 1:50 e 1:100. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 60 minutos. Os soros foram descartados, e a placa foi lavada seis vezes. Distribuiu-se o anti-IgG caprino (molécula inteira) marcado com peroxidase produzido em

burro (SIGMA®) nas diluições de 1:1000 e 1:1500 em TI. A placa foi incubada a 37°C por 60 minutos. Repetiu-se o processo de descarte e seis lavagens. Para a revelação, utilizou-se o substrato tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 5,0) com adição de 0,02% de H₂O₂ e 0,2mg/mL de σ -phenylenediamine (OPD), por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi bloqueada pela adição de 20µL de 0,4 M H₂SO₄. A intensidade da cor da reação foi determinada por absorvância em leitor de microplacas com comprimento de onda de 492nm.

A diluição ótima do soro foi determinada pela diferença entre as densidades ópticas obtidas nas leituras dos soros positivos e negativos; aquela que apresentou maior diferença nas diferentes concentrações de antígeno foi escolhida (Pinheiro, 2001). A partir daí, foi determinado o ponto de corte do Elisa-i, com a utilização de duas placas, sendo 41 soros diferentes de caprinos adultos sabidamente soronegativos para cada placa, totalizando 82 amostras. Os soros testes de Elisa-i foram realizados em duplicata.

O antígeno utilizado na técnica de WB foi preparado por meio da precipitação do sobrenadante com polietilenoglicol - PEG-8000 a 40% até a concentração final de 8%, durante um período de 18h a 4°C; subsequentemente, foi centrifugado a 4°C a 12000g por 60min. O sedimento foi ressuspenso em TNE (10,0mM tris-HCl, pH 7,4; 10,0mM NaCl; 1,0mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral; em seguida, foi ultracentrifugado a 42000g por 120min em colchão de sacarose (25% em TNE), conforme protocolo de Dantas *et al.* (2008). O sedimento foi ressuspendido em PBS contendo 2x10⁻⁴ M de *phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF), sendo a concentração proteica total determinada pelo método de Bradford (1976), e o antígeno mantido a -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

A técnica de *Western Blot* foi padronizada a partir de modificações no protocolo de Aragão *et al.* (2008). Para determinação das bandas proteicas do vírus, foi preparado um gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 4% de concentração e 12,5% de separação. Nos locais de aplicação das amostras, foram utilizadas concentrações de 6µg, 12µg e

18µg de antígeno, acompanhado com padrão de peso molecular LMW Electrophoresis (Pharmacia Biotech®), com bandas de 20; 30; 43; 67 e 94KDa. Para a migração eletroforética, utilizou-se aparelho da BIO-RAD, modelo Power Pac™ HC, ajustado para a programação inicial de 300 Watts (W), 1,00 Amperes (A) e 170 Volts (V). As proteínas do gel foram coradas com azul de Comassie, escaneadas e analisadas por meio do *software* Bio Doc-IT-LS® 6.0 do VisiDoc-IT, gel documentation System da UVP.

Para padronização das diluições do soro, do conjugado e do tempo de revelação no WB, foram preparados dois géis utilizando-se a menor concentração de antígeno. As bandas proteicas de cada gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (MN) (PROTAN BA 85 is stuck 150 X 200mm de 0,45µm), com auxílio de equipamento da BIO-RAD, programado inicialmente para 300W, 1,00A e 100V, por 60 minutos. Após a transferência, as duas membranas foram colocadas em recipiente contendo corante Ponceau (SIGMA), sob agitação, até que fossem visualizadas as bandas de proteínas.

As proteínas foram bloqueadas numa solução de PBS mais 0,3% de Tween 20, por 60 minutos e lavadas com solução de PBS mais 0,05% de Tween 20 por três vezes, cinco minutos cada lavagem. Cada membrana foi recortada em tiras, que foram enumeradas e colocadas em tubos de ensaio de 5mL. Para cada membrana foi utilizado o soro padrão positivo e o soro padrão negativo para CAEV do *kit* comercial (Veterinary Diagnostic, ICA - USA) e cinco amostras. O conjugado utilizado foi o conjugado anti-IgG caprino (molécula inteira), marcado com peroxidase produzido em coelho (Sigma®).

Os soros e o conjugado foram diluídos em solução PBS. Foram testados dois protocolos. Para uma membrana, foi adotada a diluição de 1:50 de soro por 30 minutos e de conjugado 1:15000 por 60min. Na outra membrana, utilizou-se 1:100 de soro por 30min e conjugado 1:18000 por 30min. Após o tempo de reação dos soros testes, as tiras foram submetidas a três lavagens com PBS mais 0,05% de Tween 20, por cinco minutos cada. Em seguida, foi adicionado o conjugado. Após o tempo de incubação do conjugado de 60 ou 30 minutos, para os protocolos I e II, respectivamente, as tiras da

membrana foram lavadas duas vezes com PBS mais 0,05% de Tween 20 e uma vez com PBS, cinco minutos cada; em seguida, foram retiradas dos tubos de ensaio e colocadas em um recipiente. Revelou-se a MN numa solução de DAB/4-Chloronaphthol (solução A- 12mg de Diaminobenzidine – Sigma - em 12mL de PBS, solução B- 5mg de 4-Chloronaphthol - Sigma - adicionado a 2mL de metanol mais 10mL de PBS. Misturaram-se as duas soluções e acrescentaram-se 10µL de H₂O₂ a 30%) por 15 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com adição de água destilada.

Os dados foram tabulados no programa Excel® e analisados estatisticamente nos programas *Win Episcopy 2.0* e *EPI Info™ 7.0*, obtendo-se os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância dos testes, índice Kappa e qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

O antígeno produzido para o Elisa-i apresentou uma concentração proteica de 0,82 µg/µL. A padronização do teste Elisa-i foi realizada variando-se a concentração de proteína de antígeno por poço, de soro e conjugado. As melhores diluições obtidas de soro e conjugado foram de 1:100 e 1:1500, respectivamente, na concentração de antígeno de 0,5µg/poço. O ponto de corte foi obtido por meio das médias da absorbância dos 82 soros negativos mais três vezes o desvio-padrão, resultando no valor de 0,398.

A concentração proteica do antígeno produzido para o WB obtida no Bradford foi de 4,25µg/µL. Na eletroforese, as bandas de proteínas encontradas no gel em KDa foram: 14; 22; 26; 28; 33; 36; 39; 45; 55; 67; 79; 86; 95; 103; 115; 127; 135 e 142. Com a realização da transferência e WB, somente algumas dessas bandas proteicas foram imunorreagentes, entre elas, as de 28 KDa; 45 KDa e a de 67KDa.

As melhores diluições do WB de soro e conjugado foram de 1:50 e 1:15000, respectivamente. A escolha desta foi por exibir melhor reação equivalente à proteína de peso molecular 28KDa (Fig. 1), que é a mais imunogênica.

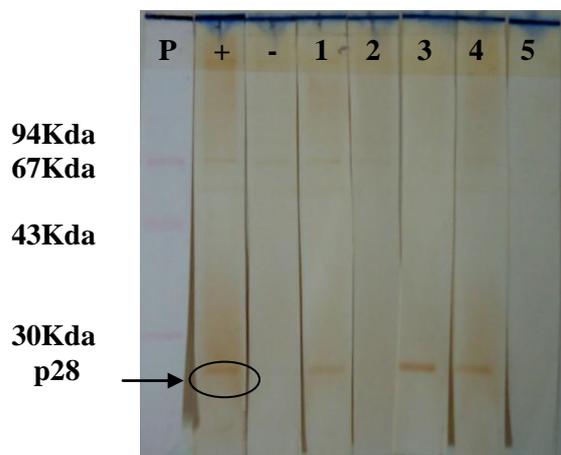


Figura 1. Padronização do *Western Blot* para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. Diluição do soro 1:50 e do conjugado 1:15000. Padrão de peso molecular (P), controle positivo (+), controle negativo (-) e soros testes (1 a 5).

O teste de Elisa-i detectou 11,7% (26/222) de animais soropositivos, enquanto apenas 4,5% (10/222) foram reagentes no IDGA (Tab. 1).

Tabela 1. Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de Elisa-i e IDGA para detecção de anticorpos contra CAEV.

		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
Elisa-i	Positivo	7	19	26
	Negativo	3	193	196
	Total	10	212	222

Sensibilidade: 70%; especificidade: 91%; valor preditivo positivo: 26,9%; valor preditivo negativo: 98,5%; índice *kappa*= 0,35; qui-quadrado: 28,76.

Das amostras testadas por WB, observou-se que 30,6% (68/222) foram soropositivas. Os valores estimados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância, índice Kappa e qui-quadrado (χ^2) quanto à comparação dos resultados obtidos para os testes de WB e IDGA estão demonstrados na Tab. 2.

Todas as amostras reagentes no IDGA estão em concordância com os resultados do WB (Tab. 3), mas três não foram consideradas soropositivas para o ponto de corte estabelecido no Elisa-i.

Tabela 2. Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de WB e IDGA para detecção de anticorpos contra CAEV

		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
Western Blot	Positivo	10	58	68
	Negativo	0	154	154
	Total	10	212	222

Sensibilidade: 100%; especificidade: 72,6%; valor preditivo positivo: 14,7%; valor preditivo negativo: 100%; índice *kappa*= 0,2; qui-quadrado: 20,42.

Tabela 3. Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de WB e Elisa-i para detecção de anticorpos contra CAEV

		Elisa-i		
		Positivo	Negativo	Total
Western Blot	Positivo	22	46	68
	Negativo	4	150	154
	Total	26	196	222

Sensibilidade: 84,6%; especificidade: 76,5%; valor preditivo positivo: 32,4%; valor preditivo negativo: 97,4%; índice *kappa*= 0,36; qui-quadrado: 37,56.

A classificação do índice Kappa das análises com IDGA/WB, Elisa-i/IDGA e WB/Elisa-i foram expressas como razoáveis segundo Thrusfield (1995); já a IDGA mostrou pobre concordância com o WB.

DISCUSSÃO

Determinar o verdadeiro *status* do animal é tarefa difícil, pois a CAE consiste em uma doença com progressão lenta e soroconversão muitas vezes tardia (Castro *et al.*, 1999). Segundo Clavijo e Thorsen (1995) e Hanson *et al.* (1996), os baixos níveis de anticorpos, a soroconversão tardia e as reações soropositivas intermitentes são o grande problema para o controle dessa virose.

Com relação ao diagnóstico sorológico, o IDGA e o Elisa-i são os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal para a infecção por LVPR (OIE, 2010).

Neste estudo, o baixo percentual de positividade dado pelo IDGA pode, em parte, ser explicado pelo tipo de antígeno utilizado. O antígeno produzido na Embrapa Caprinos e Ovinos detecta principalmente anticorpos antiproteína p28 do CAEV. Tal escolha influencia os resultados do IDGA, sendo que a utilização de antígeno com duas proteínas (glicoproteína

gp135 e coreproteína p28) promove o aumento da sensibilidade do teste (Pinheiro *et al.*, 2010). Adams e Gorham (1986), ao compararem dois antígenos do CAEV, verificaram que o antígeno produzido com a gp135 detectou um maior número de animais positivos que aquele produzido com a p28. Entretanto, existiam animais que apresentavam somente anticorpos contra a p28.

O tempo para o animal produzir anticorpos detectáveis no teste IDGA é longo, podendo ocorrer até 18 meses após a identificação pelo PCR ou, até mesmo, não acontecer à detecção (Wagter *et al.*, 1998). Rimstad *et al.* (1993) demonstraram que a soroconversão tardia acontece mesmo quando são utilizados testes com sensibilidade analítica superiores à da IDGA, como os testes imunoenzimáticos, por exemplo.

Com o objetivo de observar como a expressão de anticorpos varia durante o tempo em animais soropositivos, Hanson *et al.* (1996) utilizaram IDGA para detectar anticorpos em caprinos naturalmente infectados pelo CAEV contra os antígenos gp135 e p28 do vírus Maedi-Visna (MVV). Os autores observaram que os caprinos testados expressavam anticorpos tanto contra gp135 como para p28. Entretanto, ocorreu maior frequência de anticorpos contra gp135 em animais velhos que reagiam a apenas uma das proteínas virais. Além disso, a expressão de anticorpos para o CAEV variou ao longo do tempo, evidenciando que reações soropositivas e soronegativas podem ocorrer intermitentemente.

Na padronização do teste Elisa-i foi observado que o soro reagente do *kit* comercial (Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA), abundante em anticorpos contra a gp 135 (segundo as especificações do *kit*) apresentou valores de absorvância superiores ao ponto de corte, enquanto o soro positivo do *kit*, rico nas proteínas virais gp135 e p28, exibiu valores de absorvância bem superiores ao ponto de corte. Com base nisso, considerou-se que o antígeno produzido para o teste de Elisa-i possuía quantidades suficientes das duas proteínas para serem detectadas.

A sensibilidade do teste Elisa-i com relação ao IDGA obtido no presente estudo foi de 70,0% (Tab. 1). Estes dados corroboram os relatados

por De Andrés *et al.* (2005) e Torres *et al.* (2009). Contudo, os resultados de sensibilidade e especificidade do Elisa, em comparação ao IDGA, não estão em concordância com os referidos por Castro *et al.* (1999), que destacaram menor sensibilidade (54,2%) e maior especificidade (100%).

Deve-se considerar que, além dos fatores inerentes aos testes, existem animais com resposta imunológica seletiva para determinados antígenos (Johnson *et al.*, 1983; Rimstad *et al.*, 1993), portanto pequenas alterações antigênicas podem influenciar a sensibilidade do teste de IDGA (Pinheiro *et al.*, 2010), bem como o Elisa-i.

O *Western blot* ou *immunoblot* é um teste mais sensível que Elisa, porém possui como desvantagem o fato de ser uma técnica laboriosa e demorada, que necessita da separação das proteínas por eletroforese antes que ocorra a transferência delas para a membrana de nitrocelulose (Pinheiro, 2001).

A proteína viral gp135 não foi transferida para MN. Corroborando este achado, Celer Jr. *et al.* (1998) verificaram, por WB, que a gp135 só foi evidente em soros extremamente positivos e, portanto, não a utilizaram para confirmação de diagnóstico. Ramirez *et al.* (1992), ao trabalharem com HIV, verificaram que as nucleoproteínas (p24) são mais estáveis no WB que as glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrânicas (gp41). As glicoproteínas são relativamente instáveis e passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção de antígeno (Rimstad *et al.*, 1993), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde podem ocorrer perdas de até 50% dessas proteínas virais (McGrath *et al.*, 1978), ou até mesmo perdas espontâneas das partículas virais liberadas depois de vários dias de cultivo (Castro *et al.*, 1999).

No entanto, o WB conseguiu ser eficaz na detecção precoce quando comparado com os outros métodos aplicados neste estudo, mostrando sensibilidade de 100% e especificidade de 72,6% quando comparado ao IDGA, e de 84,6% e 76,5%, respectivamente, em relação ao Elisa-i. Os dados mostraram-se significativos para o qui-quadrado ($p < 0,001$).

Embora o teste de WB seja mais dispendioso, mostrou-se mais sensível e específico quando comparado ao Elisa-i, confirmando os resultados de Celler *et al.* (1998), que também afirmam ser ideal, em estudos de prevalência, dispor de duas técnicas como critério independente e seguro para classificar uma população.

CONCLUSÕES

Os testes de Elisa-i e WB apresentaram melhores resultados quando comparados a IDGA, sendo mais sensíveis. O WB, por sua vez, é mais sensível que o Elisa-i na detecção de anticorpos anti-CAEV. Portanto, essas técnicas podem ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico precoce de animais infectados com o vírus da artrite-encefalite caprina.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Caprinos e Ovinos; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.S.; GORHAM, J.R. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Science.*, v.40, p.157-160, 1986.
- ARAGÃO, M.A.C.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A. *et al.* Maedi-Visna Vírus: produção de antígeno, análise proteica e antigênica. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, p.423-429, 2008.
- BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H.H. *Handbook of Immunoblotting of Proteins: technical descriptions*. Florida: CRC Press, 1988. 265p.
- BRADFORD, M.M.A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-54, 1976.
- CASTRO, R.S.; GREENLAND, T.; LEITE, R.C. *et al.* Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. Gen. Virol.*, v.80, p.1583-1589, 1999.
- CELER Jr., V.; CELER, V.; NÉMCOVÁ, H. *et al.* Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus Elisa and IDGA test. *Zentralbl. Veterinarmed B.*, v.45, p.183-188, 1998.
- CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Bacterial expression of the caprine arthritis-encephalitis virus gag and env proteins and their use in enzyme-linked-immunosorbent-assay. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, p.841-848, 1995.
- DANTAS, T.V.M.; ARAÚJO, S.A.C.; PINHEIRO, R.R. *et al.* Desenvolvimento e padronização de um Elisa indireto para diagnóstico de maedi visna em ovinos. *Ci. Anim. Bras.*, v.9, p.181-187, 2008.
- DE ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J. *et al.* Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, v.107, p.49-62, 2005.
- FRANKE, C.R. *Controle Sanitário da Artrite-Encefalite Caprina*. Salvador: EDUFBA, 1998. 70p.
- GOUVEIA, A.M.G.; MELO, L.M.; PIRES, L.L.; PINHEIRO, R.R. Microimunodifusão em Gel de Ágar para o diagnóstico sorológico de infecção por Lentivírus de Pequenos Ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27., 2000, Águas de Lindóia, *Anais... Águas de Lindóia: [s.n.] 2000. p.33. (Resumo)*.
- GREENWOOD, P.L. Effects of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, v.22, p.71-87, 1995.
- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSON, K. Long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Vet. Scand.*, v.37, p.31-39, 1996.
- JOHNSON, G.C.; BARBET, A.F.; KLEVJERANDERSON, P.; MCGUIRE, T.C. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infec. Immunol.*, v.2, p.657-665, 1983.

- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- McCONNELL, I.; PETERHANS, E.; ZANONI, R.G. Concordance with reference sera of a recombinant protein Elisa for maedi-visna antibody detection. *Vet. Rec.*, v.142, p.431-433, 1998.
- McGRATH, M.; WITTE, O.; PINCUS, T.; WEISSMAN, I.L. Retrovirus purification: Method that conserves envelop glycoprotein and maximizes infectivity. *J. Virol.*, v.25, p.923-927, 1978.
- OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2010. Disponível em <<http://www.oie.int>>. Acessado em: 5 jul. 2012.
- PINHEIRO, R.R. Vírus de Artrite Encefalite Caprina: *Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (Elisa e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará*. 2001. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PINHEIRO, R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.133-137, 2010.
- RAMIREZ, E.; URIBE P.; ESCANILLA, D. et al. Reactivity patterns and infection status of serum samples with indeterminate Western Immunoblot test for antibody to Human Immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p.801-805, 1992.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p.1858-1862, 1993.
- THRUSFIELD, M.V. *Veterinary Epidemiology*. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 1995. 479p.
- TORRES, J.A.; CAMPOS, G.S.; FREITAS, M.M. et al. Produção de antígeno viral para o diagnóstico da artrite-encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (Elisa). *R. Cienc. Med. Biol.*, v.8, p.107-114, 2009.
- VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C. et al. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J. Vet. Diag. Investigations.*, v.13, p.301-307, 2001.
- WAGTER, L.H.A.; JANSEN, A.; BLEUMINKPLUYM, N.M.C. et al. PCR detection of lentiviral gag segments DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Communic.*, v.22, p.355-362, 1998.
- ZANONI, R.; KREIG, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.*, v.27, p.580-582, 1989.