

PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA PROTEÍNA-G (ELISA-G) PARA DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR) EM CAPRINOS

OLIVEIRA, M. M. M.¹, GOMES, S. M.², CAMPOS, A. C.³,
NASCIMENTO, S. A. N.⁴, CASTRO, R. S.^{5*}

RESUMO

Para o diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) preconiza o uso da imunodifusão em gel de agar (IDGA) e do ELISA. O ELISA apresenta maior sensibilidade do que a IDGA, porém existe o risco de ocorrerem resultados falso-positivos. Com o intuito de minimizar estas reações falso-positivas, foi padronizado um ELISA utilizando conjugado de proteína-G (ELISA-G), que se liga com grande afinidade às imunoglobulinas caprinas e ovinas. O ELISA-G foi padronizado partindo das condições de reação estabelecidas em um ELISA-indireto (ELISA-i), usando-se como padrão de definição de positividade e negatividade dos soros os testes de IDGA e o *western blot* (WB) associados em paralelo. Os valores da relação positivo/negativo (P/N) para os soros padrão foi significativamente superior ($P < 0,05$) no ELISA-G (10,9) do que no ELISA-i (4,8). Ao testar um grupo de soros positivos e negativos, observou-se, basicamente, o mesmo comportamento, com valores de P/N, no ELISA-G de 4,68 e no ELISA-i de 3,33, demonstrando maior capacidade de discriminação no caso do ELISA-G, o que é altamente desejável em padronização de ensaios imunoenzimáticos (EIE). Este teste necessita ser validado (estimativa da sensibilidade e especificidade) com base no teste de um número significativo de amostras da população de caprinos e ovinos, representativas das diferentes condições epidemiológicas existentes no Brasil, para que possa ser utilizado no diagnóstico sorológico de LVPR em programas de controle de LVPR.

INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes podem ser infectados por um grupo de vírus genericamente denominado de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), que compreende vários isolados, distribuídos em cinco grupos filogenéticos, que compartilham similaridades genética, de mecanismo de replicação, morfologia e interação biológica com os hospedeiros (SHAH et al., 2004). Os protótipos dos dois grupos principais são os vírus Maedi-Visna (MVV), também denominado Pneumonia Progressiva (OPPV) e o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), originalmente isolados de ovinos e caprinos, respectivamente. Estes vírus causam infecção caracterizada, muitas vezes, por animais soropositivos aparentemente saudáveis, assim, a sorologia tem sido o meio mais frequentemente utilizado para o diagnóstico da infecção pelos LVPR (CALLADO et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) preconiza a utilização da imunodifusão em gel de agar (IDGA) e do ELISA no diagnóstico de LVPR. A

¹ Doutora em Ciência Veterinária, Bolsista de Fixação de Pesquisado/FACEPE/UFRPE

² Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

³ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

⁴ Biólogo do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

⁵ Professor Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52.171-900, Recife-PE. E-mail: rscastro@dmv.ufrpe.br

IDGA é um teste que apresenta boa aceitação pelo baixo custo, especificidade, além da praticidade de execução, porém a leitura dos resultados requer experiência. O ELISA é mais sensível do que a IDGA, fácil de ser executado, passível de automação, o que possibilita o exame de grande número de amostras. Além disso, apresenta estabilidade dos reagentes e emprego destes em quantidades mínimas, porém requer um antígeno mais puro do que o utilizado na IDGA e uma estrutura laboratorial mais sofisticada (OIE, 2006).

No Brasil, um ELISA indireto (ELISA-i) e um *labeled avidin-biotin* ELISA (LAB-ELISA) (CASTRO et al., 1999) foram desenvolvidos e posteriormente avaliados. O LAB-ELISA demonstrou um número significativo de resultados falso-positivos (Castro² comunicação pessoal, 2007), a exemplo de outros ELISA (ZANONI et al., 1989; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005). Em um estudo soroepidemiológico de agalaxia contagiosa em ovinos causada por *Mycoplasma agalactiae*, muitos soros testados em um ELISA-i utilizando conjugado anti-ovino, apresentaram resultados falso-positivos, que foram eliminados com a utilização de conjugado proteína-G (ELISA-G) (LAMBERT et al., 1998), pois sabe-se que esta proteína se liga com elevada afinidade à IgG de ovinos e caprinos (AKERSTROM et al., 1985). Desta forma, disponibilizar um ELISA-G para diagnóstico de LVPR seria interessante para minimizar os riscos de reações inespecíficas, com a vantagem adicional em relação ao ELISA-i de poder testar simultaneamente amostras de ambas espécies. Pelo exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de padronizar um ELISA-G para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR).

MATERIAL E MÉTODOS

O ELISA-G foi padronizado partindo das condições de reação estabelecidas em um ELISA-i, usando-se como padrão de definição de positividade e negatividade dos soros, a IDGA e o *western blot* (WB). A IDGA foi realizada utilizando-se um *kit* comercial (Antígeno CAEV – IDGA; Biovetech[®], Brasil) seguindo as recomendações do fabricante, enquanto que o WB foi realizado com fitas de nitrocelulose sensibilizadas com antígeno CAEV, de acordo com o protocolo descrito por OLIVEIRA et al. (2007). Com base neste critério foram definidos os padrões positivo (soro positivo kit CAEV) e negativo, bem como foram selecionadas amostras (8 positivas e 10 negativas) de soro de um rebanho caprino monitorado para controle de LVPR.

Para produção de quatro partidas de antígeno empregados nos ELISA, foram utilizadas células epiteliais de córnea cultivadas e infectadas segundo OLIVEIRA et al. (2007). Os sobrenadantes (sbn) das culturas celulares, foram coletados, congelados e descongelados três vezes, clarificados por centrifugação a 3.300g por 20 minutos a 4°C, e submetidos a protocolo de purificação de antígenos descrito por HOUWERS et al. (1982) com algumas modificações. O antígeno foi precipitado com polietilenoglicol (PEG) 8.000 a 40% (p/v) em solução salina fosfatada (PBS) pH 7,6. A solução de PEG 8.000 foi adicionada lentamente, até concentração final de 10%. A precipitação transcorreu *overnight* a 4°C sob leve agitação. Em seguida o material foi centrifugado a 3.773g por 60 minutos a 4°C, o sbn foi descartado e o *pellet* ressuspensão em solução tampão TRIS-NaCl-EDTA (TNE) 10mM, pH 7,4, até 0,1% do volume inicial. Este concentrado foi centrifugado em gradiente contínuo de sacarose (25%) a 21.460g por 2 horas e meia, a 4°C, e o *pellet*

ressuspensão em solução tampão TNE 10mM, pH 7,4. O antígeno foi tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS) até uma concentração final 0,1%, e com 2×10^{-4} M de *Phenylmethanesulphonylfluoride* (PMSF) e azida sódica a 1%. A concentração protéica foi estimada, utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão, pela técnica descrita por Bradford, modificada por SEDMAK e GROSSBERG (1977).

Os ELISA-G e ELISA-i foram padronizados de forma a se obter a maior diferença entre as densidades óticas (DO) dos soros positivo e negativo e maior rendimento dos reagentes. O conjugado anti-cabra peroxidase foi produzido segundo CASTRO et al. (1999), diluído de 1/25 a 1/3.200 e titulado utilizando IgG de cabra 1/100 a 1/400, como fase sólida, obtida pela purificação com ácido caprílico, de plasma de um animal que apresentava forte reação na IDGA.

O antígeno foi diluído (1/100, 1/200 e 1/400) e titulado frente à diluição de 1/50 de um soro caprino positivo e um negativo para LVPR, na diluição do conjugado anti-cabra peroxidase (1/400). O conjugado proteína-G³ foi titulado frente ao antígeno nas diluições de 1/25.000, 1/50.000, 1/75.000, 1/90.000 e 1/100.000.

Para realização dos ELISA foram utilizadas placas de poliestireno⁴ de 96 orifícios com alta capacidade de adsorção, utilizando-se protocolo descrito por CASTRO (1999).

Para avaliação dos ELISA foram calculadas as médias dos valores absolutos das DO de soros padrão positivo e negativo e de amostras de campo, positivos e negativos, assim classificados pelos seus resultados nos testes de IDGA e WB. Foi realizada uma análise de variância destas médias empregando-se o teste *t* de *Student*, com intervalo de confiança de 95% (REIS, 2003). A repetibilidade do teste foi verificada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV) de acordo com a OIE (2006). Para isto foram realizados cinco testes de ELISA-i e ELISA-G, em dias diferentes, utilizando seis repetições de 12 soros caprinos.

REULTADOS E DISCUSSÃO

Foram produzidas quatro partidas de antígeno, a partir de células epiteliais de córnea, infectadas com a amostra CAEV Cork, nas quais por volta da segunda semana pós-inoculação observou-se efeito citopáticos caracterizados pela formação de sincícios, caracterizados por vacuolização e células gigantes multinucleadas (CALLADO et al., 2001, OLIVEIRA et al., 2007). Estes antígenos tiveram concentração protéica média de 0,51mg/ml, o que corresponde a uma concentração de 51µg de proteína antigênica por poço, resultado que foi superior ao encontrado por TORFASON et al. (1992), que obtiveram concentração protéica de 0,48mg/ml, quando trabalharam com antígeno Maedi-Visna K1514, replicados em células de plexo coróide ovino. Por outro lado, CASTRO et al. (1999) ao produzirem antígenos para ELISA, utilizando a amostra CAEV Cork replicada em células de membrana sinovial (MS), obtiveram concentração protéica 3,8 vezes maior (1,91mg/ml) e título do antígeno (1:400) quatro vezes maior ao obtido neste trabalho (1:100) (Tabela 1). Estes resultados de rendimento em massa e de título do antígeno, inferiores aos obtidos por CASTRO et al. (1999) podem ser explicados, em parte, pela velocidade de centrifugação em gradiente de sacarose empregada neste

³ Sigma, USA

⁴ COASTAR® Corning, USA

trabalho, favorecendo, possivelmente, a retenção de partículas virais sobre o colchão de sacarose e conseqüentemente menor concentração protéica no precipitado.

Os títulos dos conjugados anti-cabra peroxidase e proteína-G, frente ao antígeno diluído 1/100 foram de 1:400 e 1:90.000, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1 – Titulação do antígeno e do conjugado anti-cabra peroxidase utilizando um ELISA indireto (ELISA-i)

| Razão P/N ¹ | | | | |
|------------------------|----------------------|-------|-------|-------|
| Diluição do conjugado | Diluição do antígeno | | | |
| | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 |
| 1/400 | 1,20 | 4,80 | 2,99 | 2,03 |
| 1/800 | 1,10 | 3,74 | 2,38 | 1,77 |
| 1/1600 | 1,12 | 2,68 | 1,28 | 1,30 |
| 1/3200 | 1,06 | 1,95 | 1,17 | 1,36 |

¹ Razão entre as DO dos soros padrão positivo e negativo.

Nestas condições o soro padrão positivo apresentou DO média de 0,482 ± 0,095 para o ELISA-i e 0,696 ± 0,117 para o ELISA-G; os negativos 0,100 ± 0,095 e 0,064 ± 0,002, respectivamente. Assim, os valores da relação positivo/negativo (P/N) para os soros padrão foi significativamente superior ($P < 0,05$) no ELISA-G (10,9) do que no ELISA-i (4,8). Ao testar um grupo de soros positivos e negativos observou-se, basicamente, o mesmo comportamento, com valores médios de P/N, no ELISA-G de 4,68 e no ELISA-i de 3,33, demonstrando maior capacidade de discriminação no caso do ELISA-G, o que é altamente desejável em padronização de ensaios imunoenzimáticos (EIE) (OIE, 2006). Deve-se destacar que a maior diferença entre os padrões seria esperada, pois o soro padrão positivo apresenta alto título, como verificado pela sua forte reação frente ao antígeno na IDGA.

Tabela 2 – Titulação de conjugado proteína-G empregada nos testes de ELISA-G para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

| Razão P/N ¹ | | | | | |
|------------------------|----------------------|----------|----------|----------|-----------|
| Diluição do antígeno | Diluição do antígeno | | | | |
| | 1/25.000 | 1/50.000 | 1/75.000 | 1/90.000 | 1/100.000 |
| 1/100 ² | 6,88 | 7,88 | 9,88 | 10,90 | 6,97 |

¹ Razão entre as DO dos soros padrão positivo e negativo

² Conforme definido na titulação do ELISA-i.

Os ELISA mostraram alta repetibilidade, com coeficiente de variação (CV) interplaca igual a 4,74% para o ELISA-G e 2,90% para o ELISA-i. Segundo a OIE (2006) CV menores que 20% demonstram que o teste apresenta a repetibilidade necessária para a etapa de padronização em que o teste se encontra.

Embora reagindo no ELISA com o soro padrão positivo, os antígenos quando testados frente ao mesmo soro na IDGA não formaram linha de precipitação. Isto pode ter sido determinado pelo baixo título do antígeno ou por

alterações físico-químicas causadas pelo tratamento com SDS dos antígenos deste trabalho, capaz de interferir negativamente na formação da linha de precipitação, pois CASTRO et al. (1999) ao testarem antígenos produzidos para uso em EIE (ELISA-i e LAB-ELISA), sem adição de SDS, frente ao soro padrão anti-CAEV de um kit IDGA comercial (Veterinary Diagnostic Technology, Inc., USA) observaram linhas fortes de precipitação entre eles.

O teste de caprinos e ovinos está preconizado no Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose em Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR), pela realização da IDGA. Como ambas as espécies são susceptíveis à infecção por LVPR, seria altamente desejável o uso de um teste para pesquisa simultânea de anticorpos anti-LVPR em ambas espécies. A IDGA tem se mostrado útil para este fim, porém seria interessante dispor de um EIE com a mesma aplicação. A utilização do conjugado de proteína-G, apresenta a possibilidade do teste de ovinos e caprinos em uma mesma placa, uma vez que a proteína-G se liga com elevada afinidade às IgG de ruminantes (AKERSTROM et al., 1985).

De acordo com a OIE (2006), o processo de padronização e validação de uma técnica laboratorial de diagnóstico é formado, basicamente, por cinco etapas: 1) projeto; 2) escolha, otimização, padronização dos reagentes, técnicas e métodos; 3) determinação das características de desempenho do teste (sensibilidade e especificidade); 4) monitoramento contínuo de seu desempenho; e 5) manutenção e realce dos critérios de validação durante o uso rotineiro do teste. Neste trabalho foi concluída a padronização do ELISA-G. Pelos resultados obtidos, e considerando certas vantagens dos EIE, o ELISA-G necessita ser validado (estimativa da sensibilidade e especificidade), com base no teste de um número significativo de amostras da população de caprinos e ovinos, representativas das diferentes condições epidemiológicas existentes no Brasil, para que possa ser utilizado no diagnóstico sorológico de LVPR em programas de controle de LVPR.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado de Michele Moreira Martins de Oliveira. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERSTROM, B.; BRONDIN, T.; REIS, K. et al. Protein G a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **Journal of Immunology**, v.135, p.2589-2592, 1985.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes (AEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M. et al. A Labelled Avidin-Biotin ELISA to Detect Antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis Virus in Goats Sera. **Veterinary Research Communications**. v. 23, p. 512-522, 1999.

CORTEZ-MOREIRA, M.; OELEMANN, W.M.R.; LILENBAUM, W. Comparation of serological methods for the diagnostic of caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 48-50, 2005.

HOUWERS, D.J., GIELKENS, A.L.J., JAN SCHAAKE, Jr. J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. **Veterinary Microbiology**, v.7, p.209-219, 1982.

LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P. et al. Detection of false-positive serum in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 70, p. 326-330, 1998.

OIE. **Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres**, 2006. disponível em: <http://www.oie.int>. acesso: dez/2006.

OLIVEIRA, M.M.O.; CASTRO, R.S.; MELO, M.A. et al. *Western blot* para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), usando protocolo simples para obtenção de antígeno. Submetido a publicação, 2007.

REIS, J.C. **Estatística Aplicada à Pesquisa em Ciência Veterinária**. Olinda, 1ª ed. 651p., 2003.

SEDMAN, J.J. e GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, p. 544-552, 1977.

SHAH, C.; HUDER, J. B.; BÖNI, J. et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and world propagation through livestock trade. **Virology**, n.319,p. 12-26, 2004.

TORFASON, E.G.; GUDNADOTTIR, M.; LOVE, A. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of visna-maedi. **Archives of Virology**. v. 123, p. 47-58. 1992.

ZANONI, R., KRIEG, A., PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.580-582, 1989.