

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células bovinas (CFBov) e sua aplicação na Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA)

RECIFE-PE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

MARIA ÁUREA DE AZEVEDO NOGUEIRA

Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células bovinas (CFBov) e sua aplicação na Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Co-orientadoras: Profa. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco e Profa. Dr^a. Rita de Cássia Carvalho Maia

RECIFE- PE

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S000r Nogueira, Maria Áurea de Azevedo

Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células bovinas (CFBov) e sua aplicação na Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA)/ / Maria Áurea de Azevedo Nogueira. - 2022.
42 f. : il.

Orientador: JOSÉ WILTON PINHEIRO JÚNIOR.

Coorientadores: LUCIANA DE OLIVEIRA FRANCO e RITA DE CÁSSIA CARVALHO MAIA.

Inclui referências e anexo(s).

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de PósGraduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

Antígenos. 2. Artrite Encefalite Caprina. 3. Cultivo Celular. 4. Detergentes. 5. IDGA. I. JUNIOR, JOSE WILTON PINHEIRO, orient. II. MAIA, LUCIANA DE OLIVEIRA FRANCO E RITA DE CASSIA CARVALHO, coorient. III. Título 1.

CDD 000.000

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células bovinas (CFBov) e sua aplicação na Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA)

Dissertação de mestrado apresentada por

MARIA ÁUREA DE AZEVEDO NOGUEIRA

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. José Wilton Pinheiro Junior (Orientador)

Dr. Sérgio Alves do Nascimento

Prof. Dr. Daniel Friguglietti Brandespim

DEDICATÓRIA

A minha mãe Rosana e ao meu pai Manoel (*in memoriam*)!

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua infinita bondade e misericórdia!

Ao meu filho João Ricardo e aos meus filhos de 4 patas Argos e Rhana.

A minha mãe Rosana e meu pai Manoel (*in memoriam*) que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Gratidão eterna aos pais maravilhosos que Deus me deu. Saudades eternas dos amores da minha vida. Nenhuma palavra seria suficiente para eu agradecer a eles por tudo que representam em minha vida. Amo vocês imensamente.

Ao meu irmão Arnaldo e minha sobrinha Lorena, a minha mãedrinha Cristina, a minha avó Rosa, ao meu avô Arnaldo (*in memoriam*), a meu padrasto Dilson e minha cunhada Amanda.

A meu esposo Ricardo.

A meus amigos e irmãos que estão comigo nessa caminhada.

A meus colegas de laboratório, em especial a Sérgio, Inês, Giselle, Lila, Davi e Bruno.

As minhas co-orientadoras, Rita Maia e Luciana Oliveira e a Daniel Brandespim.

Ao meu orientador, Wilton Junior.

Ao meu eterno desorientador Leonildo Galiza.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, pelos avanços implementados nos últimos anos.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente, ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.” (Ayrton Senna)

RESUMO

Resumo

O imunodiagnóstico aplicado à identificação da artrite encefalite caprina (CAE) é considerado a melhor alternativa para a prevenção e controle da infecção, possibilitando a detecção dos animais infectados na fase precoce. O processo de produção dos antígenos é fundamental para a realização desse teste, o que torna de suma importância o desenvolvimento de pesquisas que contribuam com sua produção. Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa produzir antígeno viral através do uso de células fibroblásticas de bovinos (CFBov) infectadas com o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), sem tratamento prévio e tratadas com os detergentes Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Triton X-100 e Tween 20, para utilização em testes de IDGA. Foram utilizadas 270 amostras de soro obtidas no banco de soro do Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, oriundas de caprinos oriundos de rebanhos do Estado, soronegativos e soropositivos testados para CAEV. Ao analisar os resultados constatou-se que 38 amostras foram positivas (14,07%) e 232 negativas (85,92%) quando testadas com antígeno puro sem nenhum tratamento; 39 amostras foram positivas (14,44%) e 231 negativas (85,55%) quando tratadas com o detergente SDS; 35 amostras foram positivas (12,96%) e 235 negativas (87,03%) quando tratadas com o detergente Triton X-100 e 36 amostras foram positivas (13,33%) e 234 negativas (86,66%) quando tratadas com o detergente Tween 20. A sensibilidade e especificidade para cada teste foi calculada referente ao antígeno comercial e os testes alcançaram 94,7% e 99,6% para o antígeno puro, 97,4% e 98,7% para o SDS, 97,2% e 98,7% para o Triton X-100 e 97,3% e 99,1% para o Tween 20, sendo o SDS o mais eficiente. O coeficiente Kappa foi 1,0. A produção de antígenos a partir de células bovinas e sua purificação utilizando SDS como detergente, mostrou-se como uma alternativa de alta qualidade e eficaz para o diagnóstico da CAE.

Palavras-chave: antígenos, artrite encefalite caprina, cultivo celular, detergentes, IDGA

ABSTRACT

The immunodiagnosis applied to the identification of caprine arthritis encephalitis (CAE) is considered the best alternative for the prevention and control of infections, enabling the detection of infected animals at an early stage. The production process of the antigens is fundamental for the performance of this test, which makes the development of research contributing to obtaining it, extremely important. The objective of this research was to produce viral antigen through bovine fibroblastic cells (CFBov) infected with the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) for use in IDGA tests, without previous treatment and treated with Sodium Duodecyl Sulfate (SDS) detergents, Triton X-100 and Tween 20. 270 serum samples obtained from the serum bank of the Animal Virology Laboratory (LAVIAN) of the Federal Rural University of Pernambuco, from goats from local herds, seronegative and seropositive tested for CAEV, were used. When analyzing the results, it was found that 38 samples were positive (14.07%) and 232 negative (85.92%) when tested with pure antigen without any treatment; 39 samples were positive (14.44%) and 231 negative (85.55%) when treated with the SDS detergent; 35 samples were positive (12.96%) and 235 negative (87.03%) when treated with Triton X-100 detergent; and 36 samples were positive (13.33%) and 234 negative (86.66%) when treated with the Tween 20 detergent. The sensitivity and specificity for each treatment was calculated and the tests reached relating to commercial antigen respectively, 94.7% and 99.6% for pure antigen; 97.4% and 98.7% for SDS; 97.2% and 98.7% for Triton X-100; and, 97.3% and 99.1% for Tween 20, with SDS being the most efficient. The kappa coefficient was 1.0. The production of antigens from bovine cells and their purification using SDS as a detergent, proved to be a high quality and effective alternative for the diagnosis of CAE.

Keywords: antigens, caprine encephalitis arthritis, cell culture, detergents, IDGA

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
3. OBJETIVOS	20
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
5. ARTIGO CIENTÍFICO	25
6. CONCLUSÕES	35

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica importante para o semiárido nordestino do Brasil, uma vez que serve como fonte de renda tanto para pequenos como para grandes produtores (FEITOSA et al., 2021). No estado de Pernambuco há uma satisfatória oferta e demanda de produtos derivados de caprinos, seja leite, carne ou pele, o que reafirma a importância da atividade para a região (TELES, 2018).

Dentre os fatores que afetam significativamente a caprinocultura leiteira destaca-se a Artrite Encefalite Caprina (CAE) (CARNEIRO, 2011), uma enfermidade multissistêmica que afeta caprinos, causada por um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* (LARA, 2005). Essa enfermidade possui caráter crônico e tem a capacidade de afetar os sistemas mamário, nervoso e articular dos animais, o que confere um quadro de queda na produção, perda de peso, maior predisposição a infecções secundárias, ocasionando descarte dos animais e conseqüentemente grandes prejuízos econômicos (BEZERRA et al., 2014). Por isso, o diagnóstico da enfermidade possibilitando a identificação e remoção de animais positivos promove melhoria na sanidade dos rebanhos, diminuindo as perdas econômicas (MARTINS, 2019).

Os métodos diagnósticos mais utilizados são os sorológicos, que incluem o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e o *Western Blotting* (WB) (RODRIGUES et al., 2014). Além da sorologia, a técnica de isolamento viral em cultivo celular é utilizada para diagnóstico, bem como para pesquisas acerca da CAE, pois pode ser utilizada não apenas como forma de identificar o agente etiológico, mas para a produção de antígenos a serem utilizados em vacinas e em testes diagnósticos (COSTA, 2004).

A produção de antígenos da CAE é de extrema importância para o desenvolvimento de testes diagnósticos de qualidade, que apresentem especificidade e sensibilidade confiáveis e de preferência que aliem baixo custo com a facilidade do teste, para que haja um efetivo controle da doença nos rebanhos. A otimização da técnica de produção e obtenção de antígenos está relacionada à utilização de tipos celulares permissivos ao vírus e à máxima recuperação dos antígenos (FARIAS, 2015; HOOP et al., 2018).

Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa produzir antígenos da CAEV através de células de origem bovina sem tratamento com detergentes e tratadas com os detergentes Triton X-100, Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tween 20.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade viral crônica, reconhecida como tal em 1980, tendo como agente causador o vírus pertencente à ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (ICTV, 2019).

O gênero *Lentivirus*, além da CAE, também abrange diversos patógenos relevantes para a saúde animal e humana, como o vírus da anemia infecciosa equina (AIE), imunodeficiência felina (FIV), imunodeficiência humana (HIV), Maedi-Visna Virus (MVV) (SOUZA et al., 2015) e o vírus da imunodeficiência bovina (BIV) (PEREIRA, 2014).

O vírus HIV, em específico, apresenta relação com o retrovírus de primatas (SIV). As primeiras infecções em humanos aconteceram na África, por meio de macacos da espécie *Cercocebusatys* (TELLES, 2017), que são animais naturalmente infectados por muitas variedades de Lentivirus e, alguns desses, ultrapassaram as barreiras das espécies e geraram mutações dos agentes originais, como é o caso do HIV-1 e HIV-2. Tal mutação pode ser explicada pelo fato dos vírus possuírem proximidade filogenética e similaridade da estrutura genômica, somado à coincidência geográfica quando associada à alta taxa de prevalência da doença (SOUZA, 2017).

O vírus da CAE é composto por genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*), sendo os genes *gag* e *pol* mais conservados e o *env* mais heterogêneo. Além disso, possuem genes de regulação (LOPES, 2011). O genoma do vírus possui, portanto, alto grau de heterogeneidade e alta mutação (FEITOSA, 2011), o que confere uma rápida evolução do vírus (CASTRO, 1998). Além disso, o vírus possui em seu envelope proteínas que trabalham na indução de anticorpos em animais portadores do vírus, que são a gp135, presente no seu envelope, e a p28, no capsídeo (LIMA, 2012).

A CAE possui distribuição mundial e é amplamente encontrada no Brasil, uma vez que possui notificação em vários Estados do país, em sua maioria, afetando rebanhos caprinos de alta produção, em decorrência da

aglomeração de animais aliada à falta de condições sanitárias adequadas, o que favorece a proliferação de patógenos infecciosos (BEZERRA et al., 2014).

A doença foi introduzida no país na década de 80, devido à importação de caprinos reprodutores, procedentes de países da Europa e da América do Norte, com o objetivo de melhorar a genética das raças brasileiras para uma melhor produção leiteira (HASEGAWA, 2010). A falta de controle adequado do vírus nesses países de origem acarretou a introdução da CAE no Brasil (LIMA et al., 2004), posteriormente impulsionada pela distribuição indiscriminada de matrizes para atender o crescimento da caprinocultura leiteira de alto padrão genético, mas infectadas pelo vírus (HASEGAWA, 2010).

A transmissão do vírus pode ocorrer tanto por via vertical como horizontal. A transmissão vertical é a mais comum e ocorre via intrauterina, de uma geração à outra, através da infecção do embrião ou do feto, bem como pela ingestão de leite ou colostro contaminados, sendo a última a forma mais comum de transmissão (CALLADO et al., 2001; CARNEIRO, 2011; SOUZA et al., 2015; TELES, 2018), devido ao fato do cabrito mamar diretamente na cabra, somado à alimentação coletiva, onde há a administração aos cabritos de misturas de colostro e de leite de várias cabras (LARA, 2002). Segundo Ahmad (2012), no que diz respeito à transmissão vertical, não se pode anular a possibilidade de transmissão durante o parto, visto que já se identificou a presença do agente viral no trato genital feminino.

A transmissão horizontal, por sua vez, ocorre de um animal para o outro pelo contato direto com o hospedeiro ou por contato indireto via fômites e, para que isso ocorra, faz-se necessário um maior tempo de contato com a secreção dos animais doentes (THRUSFIELD, 2004). A via aérea também é uma possível forma de transmissão, principalmente em criações intensivas, onde o contato entre os animais é prolongado e o controle sanitário é de difícil controle (GUEDES et al., 2001).

A CAE trata-se de uma doença de caráter multissistêmico e incurável, com forte tropismo por macrófagos e monócitos (CARNEIRO, 2011). Nos monócitos acontece a replicação viral nos estágios iniciais, mas apenas após as células tornarem-se macrófagos, acontece a replicação total (TORRES, 2009). Tal característica permite que o vírus adicione seu genoma ao sistema

imune do animal, o que permite que o vírus sobreviva aos mecanismos de defesa do hospedeiro, acarretando uma maior variabilidade genética e, em consequência, maior dificuldade de diagnóstico (FEITOSA et al., 2011). Sua replicação acontece preferencialmente nos macrófagos teciduais, o que permite sua produção e excreção no leite e em secreções respiratórias (HASEGAWA, 2010).

Os animais infectados pelo vírus da CAE muitas vezes são assintomáticos ou os sinais clínicos demoram meses ou anos até aparecerem, portanto, o diagnóstico baseado nas lesões e sinais clínicos não é suficiente (MARTINS, 2019). O diagnóstico da enfermidade deve ser realizado com a utilização de técnicas diretas e/ou indiretas. A detecção direta é realizada em cultivo celular, com o isolamento do vírus, ou por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), identificação do vírus por microscopia eletrônica ou por hibridização *in situ* (LARA, 2002). Já a identificação do vírus por técnicas indiretas envolve a detecção de anticorpos séricos com a utilização de testes de imunodifusão em gel de ágar, ensaio imunoenzimático - ELISA, *Western Blotting* e imunofluorescência indireta (RODRIGUES et al., 2014).

A artrite encefalite caprina tem se mostrado um desafio para os criadores de caprinos, uma vez que não há tratamento ou vacina que inative o vírus, dificuldade do diagnóstico, gastos com assistência veterinária, morte e descarte de animais (AZEVEDO, 2011) e falta de fiscalização no trânsito dos animais vivos (BEZERRA et al., 2014). Somado a isso, Guedes et al. (2001) relatam que a soroprevalência da CAE pode chegar a 90% e apenas 35% dos animais apresentarem sinais clínicos, tornando a doença de difícil controle devido ao seu caráter persistente e assintomático, tornando os animais como fontes de infecção importantes, o que dificulta a identificação precoce dos animais infectados e a adoção da profilaxia.

Diante da inexistência de tratamentos e vacina, a forma mais eficaz de controle é a prevenção da doença, que inclui a realização de testes sorológicos com frequência para monitoramento e diagnóstico mais rápido; adoção de manejo sanitário adequado no que diz respeito à prevenção da transmissão pelo leite e colostro, como adoção de linha de ordenha (RODRIGUES et al., 2018); utilização de testes diagnósticos e uso da quarentena durante a

aquisição de novos animais (DANTAS; TEIXEIRA, 2011), administração de colostro termicamente tratado, de matrizes não infectadas, e utilização de material esterilizado (CASTRO, 1998).

2.2 PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DE ANTÍGENOS

As infecções causadas por vírus têm a capacidade de induzir uma resposta imunológica específica, portanto, os anticorpos que são produzidos contra determinados vírus também são bastante específicos. Desta forma, as técnicas utilizadas para a produção de antígenos, bem como a sua purificação, possuem relação direta com a sensibilidade e especificidade dos testes de detecção de anticorpos (ALVES, 2011).

Os métodos diagnósticos da CAE têm como base exames sorológicos, onde há a utilização de antígenos, que podem advir de *kits* comerciais licenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento ou de fabricação em estrutura laboratorial (OLIVEIRA et al., 2008).

Para fins de diagnóstico das lentivirose, muitos protocolos são estabelecidos para a produção e purificação de antígenos, podendo ser realizados tanto de forma simples ou combinada (OLIVEIRA et al., 2008). As técnicas são: centrifugação simples, centrifugação e ultracentrifugação em gradiente contínuo ou descontínuo de sacarose, cromatografias de troca iônica e de afinidade, filtração pressurizada e precipitação com polietilenoglicol (ALVES, 2011).

2.2.1 IMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR (IDGA)

O diagnóstico laboratorial das LPVRs é importante, visto que os sinais clínicos muitas vezes são ausentes (DIAS, 2012). Os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico da CAE são o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e a Imunodifusão em gel de ágar (IDGA).

A (IDGA) é uma técnica qualitativa (MARTINS, 2004) e mais comumente utilizada devido à sua alta especificidade, praticidade e baixo custo quando comparado com ELISA, que requer equipamentos laboratoriais mais complexos e um antígeno mais puro (NASCIMENTO et al., 2014). A IDGA apresenta

45,83% de sensibilidade e 93,33% de especificidade, enquanto o ELISA possui 93,33% e 100%, respectivamente (ALVES, 2011). A menor sensibilidade em relação a outros testes ocorre devido aos mecanismos de interação Ag-Ac que, nesse caso, necessita de várias interações por anticorpo, o que aumenta a especificidade do teste, mas diminui a sua sensibilidade (SOUZA et al., 2015). A interpretação do teste depende da experiência do avaliador (TOCHETTO, 2016), e quanto ao material a ser analisado, é possível apenas a utilização do soro sanguíneo (ALVES, 2011).

O teste baseia-se na utilização de placas de Petri com detecção da ligação de anticorpos (Ac) com o antígeno (Ag) utilizando a agarose como substrato e que, em condições ótimas, formam complexos antígeno-anticorpo que se precipitam no gel mostrando uma linha ou arco de precipitação visíveis a olho nu (SANTIN, 2002).

Na prática, o gel de agarose é preparado e colocado nas placas de Petri. Depois de solidificados, com a utilização de um microperfurador, são realizadas perfurações periféricas e uma central. Na perfuração central, adiciona-se o antígeno e, nos periféricos, os soros analisados. Após isso, as lâminas são colocadas em condições de temperatura controlada, entre 20°C e 25°C por 48 horas para que seja feita a leitura do resultado (VESCHI et al., 2013).

Os soros são considerados positivos quando há formação de linha de precipitação ligando o poço central, contendo o antígeno, e a perfuração periférica contendo o soro (ARRUDA et al., 2011). Mesmo sem apresentar sinais clínicos, os animais serão considerados positivos quando houver a formação do complexo Ag-Ac. Aqueles que testam negativo, ainda assim, devem ser monitorados, uma vez que é comum, animais apresentarem reação negativa por longos períodos (VESCHI et al., 2013).

2.2.2 CULTIVO CELULAR

O isolamento viral em cultivo celular é um método laboratorial amplamente utilizado em virologia, por tratar-se de uma técnica de alta sensibilidade, além de possibilitar identificar os tipos de microrganismos (PINHEIRO et al., 2001). Apesar disso, a técnica apresenta restrições face à possibilidade de falha no isolamento a depender do tipo de célula utilizada, da

carga viral no momento da coleta e da composição genética do vírus (FARIAS, 2015).

Para o desenvolvimento da técnica, podem ser empregados cultivos primários, secundários ou de linhagem contínua. O cultivo primário possui limitações, uma vez que as células podem estar persistentemente infectadas com outros vírus, o que pode confundir o diagnóstico. Já os cultivos secundários ou de linha são mais práticos para o diagnóstico, visto que apresentam o chamado efeito citopático (ECP) em um tempo mais curto, além de fornecerem uma melhor uniformidade e sanidade das células (VIRGINIO; TEIXEIRA, 2004).

Para os cultivos primários são utilizados tecidos animais e a dispersão inicial é feita por meio de dissociação enzimática ou explantação. Esse tipo de técnica apresenta diversas desvantagens, como alto custo para manutenção do cultivo, possibilidade de contaminação com o vírus e dificuldade na padronização do cultivo, visto que cada animal utilizado possui características próprias. O cultivo secundário, por sua vez, é obtido por dispersão do cultivo primário, com uma nova distribuição das células em novos meios de cultivo (COSTA, 2004).

A aplicação dos substratos celulares está diretamente ligada ao crescimento do vírus e à sua capacidade de causar o ECP, portanto, há a necessidade da existência de linhagens celulares contínuas, que demonstrem ECP facilmente pela microscopia de ótica (CRUZ et al., 1992).

Os cultivos celulares podem ser submetidos a uma análise cariotípica, a fim de observar possíveis alterações cromossômicas (COSTA, 2004). Os cromossomos são estruturas constituídas por Ácido Desoxirribonucleico (DNA) e outros complexos proteicos, e carregam consigo todas as informações genéticas do indivíduo, que são transmitidas por hereditariedade (MONTENEGRO et al., 2008). A identificação e classificação dos cromossomos é denominada cariotipagem e consiste na formação de uma imagem digitalizada dos cromossomos, que inicialmente passam por etapas de processamento e segmentação para, em seguida, serem submetidas analisados com base em um critério estabelecido de tamanho e padrão (KURTZ et al., 2008).

2.2.3 DETERGENTES

A recuperação do antígeno é uma etapa crucial para manter a reatividade epítopo-anticorpo, problemas nesta etapa podem provocar modificações estruturais das proteínas, podendo levar a ocorrência de ligações cruzadas causadas pela marcação do epítopo alvo, o que torna de suma importância o uso de detergentes (HOOP et al., 2018).

Os detergentes ou surfactantes são utilizados na purificação de proteínas e têm como característica a capacidade de formar micelas acima de determinadas concentrações, além de solubilizar substâncias em meio aquoso (LOPES, 2011).

Eles são classificados de acordo com a sua polaridade, podendo ser não iônico, como exemplo do Triton – X 100; aniônico, como o Dodecil sulfato de sódio (SDS); Catiônico, tendo como exemplo o Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB); e Anfótero ou Zwitterionico, como o Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB). Na produção de antígenos para diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes, o Dodecil sulfato de sódio (SDS) é o surfactante mais utilizado na rotina (LOPES, 2011).

A escolha de um antígeno tem relação direta com a eficiência da IDGA e, no que diz respeito ao diagnóstico das Lentivirose de Pequenos Ruminantes, a utilização de um antígeno que possua as proteínas gp135 e p28 aumentam a sensibilidade do teste (PINHEIRO et al., 2012). Ambos codificam proteínas estruturais presentes em basicamente todos os antígenos utilizados para o diagnóstico da CAE (ALVES, 2011) onde a p28 é considerada um antígeno dominante, apesar dos anticorpos contra ela surgirem relativamente cedo na infecção e terem seus níveis diminuídos quando os sinais clínicos estão evidentes. Os anticorpos contra a gp135, por sua vez, possuem a característica de surgirem mais tarde e se manterem na fase clínica da doença (LIMA, 2012; CARVALHO, 2017).

Vários estudos comprovam que o tratamento com SDS tem sido altamente recomendado como um método eficiente de recuperação de antígenos, e demonstram que estes detergentes apresentam alta eficiência para extração eficiente de proteínas. Os membros da família Triton são

detergentes não iônicos e são comumente utilizados para isolar proteínas sem levar as amostras a temperaturas mais altas, o que pode causar a desnaturação de muitas delas. Já o Tween-20 é um tensoativo de polissorbato com uma porção de éster de ácido graxo e uma longa cadeia de polioxietileno, sendo surfactantes suaves, não afetam a atividade das proteínas e são eficazes na solubilização, o que o torna ideal para uso em tampões de lise celular (YANG et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito do antígeno obtido a partir de células bovinas (CFBov) para o diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina através do teste de IDGA

3.2. Específicos

- Avaliar a capacidade de crescimento das células CFBov infectadas com o CAEV mediante o processo de criopreservação;
- Realizar uma análise comparativa da eficácia do antígeno puro e após tratamento com os detergentes Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tween 20;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade dos antígenos obtidos em CFBov frente a teste comercial pela técnica de IDGA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, M. Z. A. A.; DUBREIL, L.; CHATAGNON, G.; KHAYLI, Z.; THERET, M.; MARTIGNAT, L.; CHEBLOUNE, Y.; FIENI, F. **Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) in vivo.** *Veterinary Research*, v. 43, n. 5, p. 1-7, 2012.

ALVES, L. A. O. **Produção de Antígeno e Separação da Proteína p28 Através de Microfiltração Seriada para Sorodiagnóstico da Artrite Encefalite Caprina.** 2011. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

ARRUDA, E. T.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A.; CAMPOS, A. C.; CASTRO, R. S. **Avaliação de uma Microimunodifusão em Gel De Ágar para Diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (Lvpr) em Caprinos.** *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v. 12, n. 3, p. 560-565, 2011.

AZEVEDO, D. A. A. **Lentiviroses em Pequenos Ruminantes: Aspectos Clínicos, Diagnóstico e Caracterização Molecular do Vírus.** 2019. 107 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2019.

BEZERRA, A.; STARLING, R. Z. C.; SENHORELLO, I. L.; FERREIRA, P. G.; CLIPES, R. C.; DONATELE, D. M. **Artrite Encefalite Caprina.** *PUBVET*, Londrina, v. 8, n. 21, Ed. 270, Art. 1802, 2014.

BOHLAND, E.; D'ANGELINO, J. L. **Artrite Encefalite Caprina: Avaliação dos Aspectos Produtivos e Reprodutivos de Animais Infectados e Não infectados.** *Revista de Educação Continuada do CRMV/SP*, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 04-08, 1999.

BRASIL. 2009

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. **Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): AEV e Maedi-visna): AEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, p. 87-97, jul./set. 2001.

CARNEIRO, F. F. D. **Perdas Econômicas Decorrentes da Artrite Encefalite Caprina em Rebanho Leiteiro.** 2011. 97 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2011.

CASTRO, R. S. **Lentivírus de Pequenos Ruminantes: Ensaio Imunoenzimático, Perfil Sorológico e inferências Filogenéticas.** 1998. 121 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1998.

COSTA, U. M. **Obtenção e Caracterização de Células da Membrana Sinovial Ovina Transformadas pelo antígeno T do vírus Símio 40: Influência na Variabilidade dos agentes *gag* *env* do LTR dos Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e MAEDI-VISNA (MVV) dos Ovinos.** 2004.

146 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CRUZ, A. S. C.; FIGUEIREDO, C. A.; BARBOSA, M. L.; MARTINEZ, C. H.; FOMES, L. F. S. RC-IAL. **Linhagem celular contínua de rim de coelho - características e substrato para replicação de vírus.** Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 26, n. 6, 1992.

DANTAS, T. V. M.; TEIXEIRA, M. F. da S. **Prevenção e controle da artrite-encefalite caprina (CAE).** Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2011. Disponível em: <http://infoteca.cntpia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1014569>. Acesso em: 26 de abril de 2021.

FARIAS, A. C. **Levantamento Sorológico E Isolamento De Maedi-Visnavírus Em Ovinos Naturalmente Infectados No Estado Do Pará, Brasil.** 2015. 46 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.

FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, A. A. ; ALVEZ, S. M. **Primeiro isolamento de lentivírus de pequenos ruminantes em caprino naturalmente infectado em rebanho do Rio Grande do Norte, Brasil.** Revista Arquivos do Instituto Biológico, v. 78, n. 4, p. 501-505, 2021.

FEITOSA, A. L. V. L. **Caracterização Molecular de Lentivírus de Pequenos Ruminantes Isolados no Brasil.** 2011, 175 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2011.

GUEDES, M. I. M. C.; SOUZA, J. C. A.; GOUVEIA, A. M. G. **Infecção Experimental em Cabritos pelo Vírus da Artrite Encefalite.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 53, n. 1, 2001.

HASEGAWA, M. Y. **Estudo Comparativo Entre as Formas Clínicas e Relações com as Variantes do Vírus da Artrite Encefalite Caprina Isoladas no Estado de São Paulo.** 2010, 78 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

HOOP, INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES – ICTV, 2019. **Taxonomy.** Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>. Acesso em: 01 de maio de 2021.

KURTZ, G. C.; BONINI, T.; PERLES, L. A.; SAGRILLO, M. R.; LIBRELOTTO, G. R. **Identificação automática de cromossomos humanos.** SIBGRAPI 2008 - XXI Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing, p. 33-36, Campo Grande, 2008.

LARA, M. E. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E.; GREGORY, E. L.; BIRGEL, E. H. Aspectos Clínicos da Artrite-encefalite dos Caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.6, p. 736 – 740, 2005.

LIMA, C. C. V. **Inquérito Soroepidemiológico da Artrite Encefalite Caprina na Microrregião de Juazeiro – Bahia e Comparação de Técnicas Imunodiagnósticas**. 2012. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Universidade Federal da Bahia, Juazeiro, 2012.

LOPES, C. A. F. **Produção de Antígenos do Vírus da Artrite Encefalite Caprina para Imunodiagnóstico**. 2011. 47 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

MARTINS, M. F. **Comparação entre testes IDGA (p26) e ELISA indireto (rgp 90) no diagnóstico da anemia infecciosa Equina**. 2004. 44 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MONTENEGRO, V. S.; SANTOS, V. M. V.; VEITH, M. **Análise Citogenética na Leucemia Mielóide Crônica**. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v. 10, n. 3, p. 5-12, 2008.

OLIVEIRA, M. M. M.; MELO, M. A.; ANDRADE, P. P.; GOMES, S. M.; CAMPOS, A. C.; NASCIMENTO, S. A.; CASTRO, R. S. **Western Blot para o Diagnóstico as Infecções pelos Lentivírus de Pequenos Ruminantes em Caprinos: Um Método Simples para a Produção de Antígeno**. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 75, n. 3, p. 263-270, 2008.

NASCIMENTO, B. C.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A. S.; SILVA, R. A. B.; PAULA, N. R. O.; BATISTA, M. C. S. **Ferramentas diagnósticas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto**. *Arquivos do Instituto Biológico*, vol. 81, n. 1, 2014.

PEREIRA, E. P. **Caracterização das Metaloproteinases (Mmps) no Plasma Seminal de Caprinos Sadios e Infectados pelo Vírus da Artrite Encefalite Caprina (Cae)**. 2014, 63 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2014.

PINHEIRO, R. R.; AZEVEDO, A. A.; SOUZA, A. L. M.; ARAÚJO, J. F.; SIDER, L. H.; SOUZA, T. S.; CRUZ, J. C. M. **Uso de Cultura Celular de Membrana Nictitante Caprina para Produção de Antígeno de Lentivírus de Pequenos Ruminantes**. *Embrapa Caprinos e Ovinos*, p.42. 2012.

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**. 2001. 115 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW I. G. J.; HOUSTON, D. M. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

RODRIGUES, A. S.; PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L.; ANDRIOLI, A.; OLIVEIRA, E. L.; SIDER, L. H.; SANTOS, V. W.; OLIVEIRA, L. S.; DIAS, R. P.;

GOUVEIA, A. M. G.; TEIXEIRA, M. F. S. **Avaliação de um controle Estratégico da Artrite Encefalite Caprina em Rebanho Caprino Leiteiro**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 1, Belo Horizonte, 2018.

RODRIGUES, A. S.; BRITO, R. L. L.; PINHEIRO, R. R.; DIAS, R. P.; ALVES, S. M.; SOUZA, S. T.; SOUZA, K. C.; AZEVEDO, A. A.; ANDRIOLI, A.; MAGALHÃES, D. C. T.; TEIXEIRA, M. F. S. **Padronização do Elisa indireto e Western Blot Para Diagnóstico da Artrite-encefalite Caprina**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, vol. 66, n. 2, Belo Horizonte, 2014.

SANTIN, A. P. I.; BRITO, W. M. E. D.; REISCHAK, D.; BRITO, L. A. B. **Artrite encefalite caprina: identificação de animais soropositivos no estado de Goiás**. Ciência animal brasileira, v. 3, n. 1, p. 67-71, 2002.

SOUZA, T. S.; PINHEIRO, R. R.; COSTA, J. N.; LIMA, C. C. V.; ANDRIOLI, A.; AZEVEDO, D. A. A.; SANTOS, V. W. S.; ARAÚJO, J. F.; SOUZA, A. L. M.; PINHEIRO, D. N. S.; FERNANDES, F. M. C.; NETO, A. O. C. Interspecific Transmission of Small Ruminant Lentiviruses From Goats to Sheep. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, 3, p. 867-874, 2015.

TELES, J. A. A. **Fatores de Risco Associados à Lentivirose em Rebanhos Caprinos no Estado de Pernambuco**. 2018. 76 p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2018.

THRUSFIELD, M. V. **Epidemiologia Veterinária**. 2 ed. p.223-247. São Paulo: Roca, 2004.

TOCHETTO, C.; BALBINOT A. C.; PRIOR, K. C.; DEZEN D. **Desenvolvimento de um ELISA para Detecção de Anticorpos Séricos Contra o Vírus da Leucose Bovina**. Ars Veterinária, v. 23, n. 1, 2016.

VESCHI, J. L. A.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; RAMOS, E. M.; ZAFALON, L.F. **Artrite-encefalite caprina (CAE): prevenção e controle**. Embrapa Pecuária Sudeste – Recomendação Técnica (INFOTECA-E). 2013.

VIRGINIO, C. G.; TEIXEIRA, M. F. S. Uso de Células de Linhagem TIGEF para Cultivo e Produção de Lentivírus Ovino. **Ciência Animal**, v. 14, n. 2, p. 69-75, 2004.

YANG, J.; CHEN, J.; DEL CARMEM VITERY, M.; OSEI OWUSU, J.; CHU, J.; YU, H., *et al.* PAC, an evolutionarily conserved membrane protein, is a proton-activated chloride channel. **Science**. v. 364, p. 395-399. 2019.

3. ARTIGO

Obtenção de Antígenos para o diagnóstico sorológico da artrite encefalite caprina a partir de células bovinas (CFBov)

Resumo

O imunodiagnóstico aplicado à identificação da artrite encefalite caprina (CAE) é considerado a melhor alternativa para a prevenção e controle da infecção, possibilitando a detecção dos animais infectados na fase precoce. O processo de produção dos antígenos é fundamental para a realização desse teste, o que torna de suma importância o desenvolvimento de pesquisas que contribuam com sua produção. Desta forma, objetivou-se com esta pesquisa produzir antígeno viral através do uso de células fibroblásticas de bovinos (CFBov) infectadas com o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), sem tratamento prévio e tratadas com os detergentes Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Triton X-100 e Tween 20, para utilização em testes de IDGA. Foram utilizadas 270 amostras de soro obtidas no banco de soro do Laboratório de Virologia Animal (LAVIAN) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, oriundas de caprinos oriundos de rebanhos do Estado, soronegativos e soropositivos testados para CAEV. Ao analisar os resultados constatou-se que 38 amostras foram positivas (14,07%) e 232 negativas (85,92%) quando testadas com antígeno puro sem nenhum tratamento; 39 amostras foram positivas (14,44%) e 231 negativas (85,55%) quando tratadas com o detergente SDS; 35 amostras foram positivas (12,96%) e 235 negativas (87,03%) quando tratadas com o detergente Triton X-100 e 36 amostras foram positivas (13,33%) e 234 negativas (86,66%) quando tratadas com o detergente Tween 20. A sensibilidade e especificidade para cada teste foi calculada referente ao antígeno comercial e os testes alcançaram 94,7% e 99,6% para o antígeno puro, 97,4% e 98,7% para o SDS, 97,2% e 98,7% para o Triton X-100 e 97,3% e 99,1% para o Tween 20, sendo o SDS o mais eficiente. O coeficiente Kappa foi 1,0. A produção de antígenos a partir de células bovinas e sua purificação utilizando SDS como detergente, mostrou-se como uma alternativa de alta qualidade e eficaz para o diagnóstico da CAE.

Palavras-chave: antígenos, artrite encefalite caprina, cultivo celular, detergentes, IDGA

ABSTRACT

The immunodiagnosis applied to the identification of caprine arthritis encephalitis (CAE) is considered the best alternative for the prevention and control of infections, enabling the detection of infected animals at an early stage. The production process of the antigens is fundamental for the performance of this test, which makes the development of research contributing to obtaining it, extremely important. The objective of this research was to produce viral antigen through bovine fibroblastic cells (CFBov) infected with the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) for use in IDGA tests, without previous treatment and treated with Sodium Duodecyl Sulfate (SDS) detergents, Triton X-100 and Tween 20. 270 serum samples obtained from the serum bank of the Animal Virology Laboratory (LAVIAN) of the Federal Rural University of Pernambuco, from goats from local herds, seronegative and seropositive tested for CAEV, were used. When analyzing the results, it was found that 38 samples were positive (14.07%) and 232 negative (85.92%) when tested with pure antigen without any treatment; 39 samples were positive (14.44%) and 231 negative (85.55%) when treated with the SDS detergent; 35 samples were positive (12.96%) and 235 negative (87.03%) when treated with Triton X-100 detergent; and 36 samples were positive (13.33%) and 234 negative (86.66%) when treated with the Tween 20 detergent. The sensitivity and specificity for each treatment was calculated and the tests reached relating to commercial antigen respectively, 94.7% and 99.6% for pure antigen; 97.4% and 98.7% for SDS; 97.2% and 98.7% for Triton X-100; and, 97.3% and 99.1% for Tween 20, with SDS being the most efficient. The kappa coefficient was 1.0. The production of antigens from bovine cells and their purification using SDS as a detergent, proved to be a high quality and effective alternative for the diagnosis of CAE.

Keywords: antigens, caprine encephalitis arthritis, cell culture, detergents, IDGA

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica importante para o semiárido nordestino do Brasil, uma vez que serve como fonte de renda tanto para pequenos como para grandes produtores (FEITOSA et al., 2021). Dentre os fatores que afetam significativamente a caprinocultura leiteira está a Artrite Encefalite Caprina (CAE) (CARNEIRO, 2011), uma enfermidade multissistêmica que afeta caprinos, causada por vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* (Lara, 2005). Possui caráter lento e progressivo e tem a capacidade de afetar os sistemas mamário, nervoso e articular dos animais, o que confere um quadro de queda na produção, perda de peso, maior predisposição a infecções secundárias, o que acarreta o descarte dos animais, provocando grandes prejuízos econômicos (BEZERRA et al., 2014).

Os métodos diagnósticos mais utilizados são os sorológicos, que incluem o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e o *Western Blotting* (WB) (RODRIGUES et al., 2014). Além da sorologia, a técnica de isolamento viral em cultivo celular é amplamente utilizada para diagnóstico, bem como para pesquisas acerca da CAE, pois funciona não apenas como forma de identificar o agente etiológico, mas para a produção de antígenos a serem utilizados em vacinas e em testes diagnósticos (COSTA, 2004).

A produção de antígenos da CAE é de extrema importância para o desenvolvimento de testes diagnósticos de qualidade, que apresentem especificidade e sensibilidade confiáveis e de preferência que aliem baixo custo com facilidade do teste, para que haja um efetivo controle da doença nos rebanhos. Além disso, a obtenção dos antígenos produzidos depende do tipo celular utilizado para crescimento viral e de técnicas de purificação dos mesmos (FARIAS, 2015; HOOP et al., 2018).

Objetivou-se com esta pesquisa produzir antígenos da CAEV através de células de origem bovina com ou sem tratamento com os detergentes Triton X-100, Dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tween 20, comparando sua sensibilidade e especificidade com o antígeno comercial CAE-IDGA -Biovetech.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo Celular

A cultura de células primárias de orelha bovina (CFBov) foi propagada no Laboratório de Viroses dos Animais Domésticos (LAVIAN) do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, obtidas anteriormente como descrito em NOGUEIRA (2019).

No subcultivo, a tripsinização e posterior passagem das culturas foram realizadas em frascos de 25cm², com DMEM, adicionado de Penicilina, Anfotericina B e Estreptomicina, na concentração de 4×10^4 células/mL, incubadas a 37°C em sistema fechado para a aquisição de monocamadas. Utilizou-se 10% de soro fetal bovino (SFB) para os subcultivos e 2% para culturas inoculadas com o vírus.

Amostras de soro

Foram utilizadas 270 amostras de soro (38 positivas e 232 negativas) obtidas no banco de soro do LAVIAN, provenientes de caprinos oriundos de rebanhos do Estado de Pernambuco, soronegativos e soropositivos testados para CAEV (*Kit* para diagnóstico de CAE-IDGA; Biovetech, Recife).

As amostras foram colocadas em temperatura ambiente até seu total descongelamento. Posteriormente foi realizada a homogeneização manual e utilizados 30µL para testagem frente a cada detergente. A escolha da quantidade de amostras foi através de amostragem probabilística, por conveniência.

Antígenos

O antígeno classificado como **antígeno 01** foi proveniente do *Kit* para diagnóstico de CAE-IDGA -Biovetech®, Recife, licenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com a legislação em

vigor (Decreto Nº 5.053, de 22 de abril de 2004) podendo, assim, ser usados em testes oficiais de diagnóstico. Este antígeno é utilizado na rotina laboratorial é indicado para detecção de anticorpos contra a proteína p28 do vírus da Artrite-encefalite Caprina (CAEV) em soro caprino, conforme informações do fabricante. Foi utilizado 10µL do antígeno comercial para cada amostra.

Para produção de partículas virais, as monocamadas semi-confluentes de CFBoV foram inoculadas com 0,5mL da amostra viral CAEV Cork com título de $10^{-4,5}$. Após 30 minutos de adsorção realizou-se a suplementação com DMEM contendo 2% de Soro Fetal Bovino (SFB). A partir do 10º dia pós-inoculação (PI), a cada sete dias, o sobrenadante de cada cultura foi coletado e congelado. E quando as monocamadas apresentaram mais de 70% de destruição, as garrafas foram submetidas ao congelamento e descongelamento subsequente para rompimento das células restantes e liberação de maior conteúdo de partículas virais.

As amostras de sobrenadante foram então submetidas a um processo de concentração dos antígenos, onde os sobrenadantes foram congelados e descongelados três vezes, clarificados por centrifugação a 3.300g por 20 minutos, a 4 °C e dialisados em membrana com *cut-off* de 12000 Daltons, adicionados de polietilenoglicol (PEG 6.000) a 40% em PBS (pH 7,6), a 4°C durante 48 a 72 horas, onde a amostra final foi concentrada em aproximadamente 50 vezes (ABREU et al., 1998).

Tratamentos com Detergentes

Após o processo de concentração dos antígenos, o concentrado foi submetido ao tratamento com os detergentes a seguir: Triton X-100 (Amresco) na concentração final de 0,1% (**antígeno 02**), SDS na concentração final de 0,1% (**antígeno 03**), Tween 20 na concentração final de 0,1% (**antígeno 04**). Seguido de homogeneização por 10 minutos, para que ocorresse a liberação das proteínas internas do vírion.

Também foram utilizadas as amostras de sobrenadante concentradas sem passar por nenhum tipo de tratamento ou procedimento que alterasse sua composição, o antígeno puro (**antígeno 05**).

Avaliação dos antígenos

Os antígenos foram avaliados pela produção de linhas específicas através da Técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) recomendada pela OIE (2011). Utilizou-se agarose a 1% em tampão borato, um molde em forma hexagonal, com os poços destinados aos antígenos (01 ao 05), com capacidade de 30uL para cada soro a ser testado, e o soro padrão com capacidade para 10µL. A leitura inicial foi realizada com 24 horas de incubação e ao final com 48 horas, com luz indireta sobre fundo escuro. Como controle foi utilizado soro positivo do *Kit para Diagnóstico da CAE (IDGA)* (BIOVETECH, Recife).

Análise estatística

Os resultados dos antígenos testados obtidos a partir da cultura de CFBoV puros e tratados com Triton, SDS e Tween 20, foram comparados diante os resultados do antígeno comercial e tiveram a avaliação com base no indicador de concordância ajustada - Kappa (MCGINN et al., 2004), onde o valor 1 apresenta alta concordância (Landis e Koch, 1977). Foram calculadas as Sensibilidade (Se) e Especificidade (Ep) relativas (TDR) usando o Diagnostics Evaluation Expert Panel (2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 270 amostras testadas com o antígeno comercial CAE-IDGA - Biovetech, apresentaram 38 amostras positivas (14,07%) e 232 negativas (85,92%). Com base nesses resultados foi possível analisar e calcular a eficiência dos antígenos obtidos de células bovinas (CFBoV), tanto puro quanto após os diversos tratamentos realizados para sua purificação.

A linhagem celular CFBoV vem sendo cultivada há mais de 3 anos, por mais de 40 passagens, sem alteração perceptível na morfologia ou na taxa de multiplicação celular. Em estudos prévios utilizando estas células, durante a análise microscópica, foi visto que as células não apresentavam nenhuma alteração morfológica que servisse como justificativa para a sensibilidade ao CAEV. Também não foram vistos nenhum tipo de contaminação com amostras celulares de caprinos ou ovinos, onde a análise cromossômica confirmou a identidade celular como de célula bovina.

Os resultados da análise dos antígenos e os diferentes tratamentos utilizados na detecção de anticorpos anti-CAEV estão dispostos no quadro 1.

Quando as mesmas amostras foram testadas contra o antígeno puro, sem nenhum tratamento prévio, obteve-se novamente as 38 amostras positivas (14,07%) e 232 negativas (85,92%), ocorrendo apenas uma divergência de duas amostras testadas com antígeno comercial, onde uma teve como resultado positivo e outra negativa. As linhas de precipitação se apresentaram claras e bem definidas acarretando um bom entendimento da leitura. A sensibilidade apresentada para os testes com o antígeno puro foi de 94,7% e a especificidade de 99,6%. O coeficiente Kappa foi 1,0 (Quadro 1).

Quadro 1. Análise dos antígenos e os diversos tratamentos utilizados na detecção de anticorpos contra a CAE utilizando a técnica de IDGA

Tratamento	Antígeno Comercial		Sensibilidade Relativa	Especificidade Relativa	Concordância Observada (Po)	Concordância Esperada (Pe)	Kappa	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
	Positivo	Negativo							
Puro									
Positivo	36	1	94,7	99,6	1,0	0,8	1,0	97,3	99,1
Negativo	2	231							
SDS									
Positivo	38	0	97,4	100,0	1,0	0,8	1,0	100,0	99,6
Negativo	1	231							
Triton X-100									
Positivo	35	3	97,2	98,7	1,0	0,8	0,9	92,1	99,6
Negativo	1	231							
Tween 20									
Positivo	36	2	97,3	99,1	1,0	0,8	1,0	94,7	99,6
Negativo	1	231							

Quando as amostras foram testadas contra os antígenos submetidos ao tratamento com o detergente Dodecil sulfato de sódio (SDS), obteve-se 39 positivas (14,44%) e 231 negativas (85,55%), ocorrendo divergência quando comparadas com o antígeno comercial, com três amostras a mais com resultado positivo e tendo sido o melhor detergente para melhorar a eficiência geral da técnica de diagnóstico. A sensibilidade e especificidade foram de 97,4% e 100%, respectivamente, e o coeficiente Kappa igual a 1,0 (Quadro 1).

Quando utilizados os antígenos tratados com o detergente Triton X-100 e Tween 20, obteve-se, respectivamente, 35 positivas (12,96%) e 235 negativas (87,03%), e 36 positivas (13,33%) e 234 negativas (86,66%), resultados muito próximos aos obtidos com o antígeno comercial, e com sensibilidade e especificidade menores que as obtidas com o SDS (Quadro 1).

Em relação à definição das linhas de precipitação, observou-se que as amostras tratadas com Tween 20 apresentaram-se com menor definição e com resultados inespecíficos.

Como descrito por Veschi et al. (2012), as reações são avaliadas através da observação das linhas de precipitação no ágar, formadas através da produção de imunocomplexos. A linha formada com o soro controle positivo é considerada como base para a leitura do teste. As amostras que apresentaram reação específica (positiva) e uma linha de precipitação inespecífica foram consideradas positivas.

Castro (1999) discute a importância da sorologia como ferramenta no diagnóstico laboratorial das LVPR, demonstrando que a presença de anticorpos valida a existência de infecção, agindo de forma indireta. O IDGA é recomendado como teste principal de triagem, devido a sua fácil execução e por apresentar alta especificidade (VAREA et al., 2001). Entretanto, apresenta como desvantagem a detecção apenas de níveis elevados de imunoglobulinas, podendo acarretar falso-negativos (ANDRIOLI et al., 2006). Sendo assim, é de extrema necessidade a produção de antígenos que possam detectar níveis mais baixos de anticorpos, diminuindo as reações de negatividade em animais positivos.

Callado (2004) discute que os lentivírus possuem uma grande capacidade de apresentar variações genéticas, justificado através das muitas mutações sofridas pelos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). Este fato pode justificar os bons resultados apresentados pelas células bovinas sendo utilizadas como antígenos para CAEV. Mesmo sem nenhum tratamento prévio as células apresentaram resultados significativos para o IDGA, comparável com os resultados do teste comercial.

Dentre os tratamentos realizados, o SDS apresentou maior sensibilidade e especificidade (97,4% e 100%, respectivamente), sendo considerado o melhor para o diagnóstico por IDGA utilizando os antígenos a partir das células CFBoV. Quando realizado o teste Kappa, o resultado obtido foi 1,0, sendo considerado, portanto, uma técnica sorológica de alta concordância. Nosso resultado corrobora com o descrito por Lopes Junior (2011), que afirma que o SDS é o detergente aniônico de carga negativa considerado o surfactante de preferência em pesquisas com o propósito de extrair e purificar antígenos advindos de Lentivírus de Pequenos Ruminantes, sendo simples de utilização e apresentando menor custo. Por ser classificado como um detergente aniônico forte, o SDS rompe as pontes dissulfídicas e de hidrogênio das proteínas, assumindo comportamento de polímeros não estruturados carregados negativamente (LOPES JUNIOR, 2011), ocasionando melhor purificação dos antígenos estudados e possibilitando uma maior eficiência do teste.

Em seu estudo, Lopes Junior (2011) observou que o SDS demonstrou uma linha de precipitação fraca em comparação aos outros surfactantes, o que não ocorreu no presente estudo, onde as linhas tiveram total clareza de entendimento, luminosidade e nitidez, facilitando a leitura das amostras com total clareza. É possível que a utilização das células de bovinos tenha ajudado na melhoria da qualidade do precipitado, uma vez que por não ser o hospedeiro comum deste vírus, tenha havido menor quantidade de conteúdo proteico inespecífico nos antígenos utilizados e com a remoção eficaz pelo SDS, os anticorpos do soro tenham tido um melhor acesso ao antígeno, melhorando a linha de precipitação. Neste contexto, Reischak (2000) afirma que as alterações antigênicas apresentadas ao se utilizar um antígeno

diferente do comumente utilizado nos programas de controle, modificam a sensibilidade relativa em um teste de IDGA.

Quando realizado o tratamento do antígeno com o Triton X-100, obteve-se resultado similar ao encontrado por Silva (2020) em relação à qualidade das linhas de precipitação e sua luminosidade, não havendo dificuldades em se obter resultados durante a 221leitura (Figura 1).

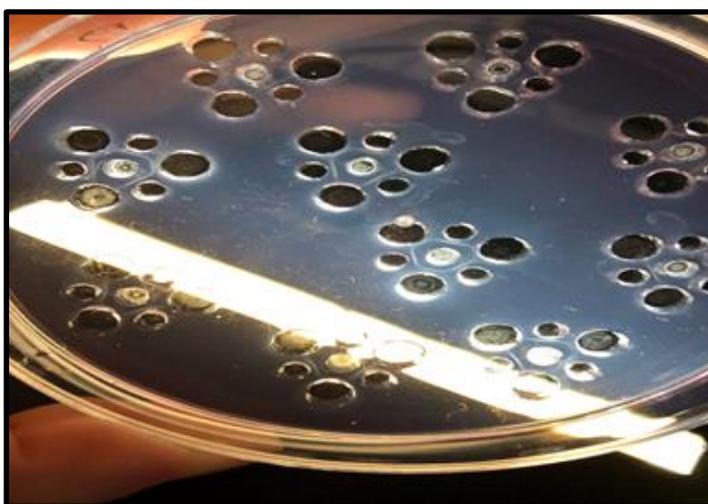


Figura 1: Imagem do teste IDGA utilizando antígeno de células CFBoV tratado com Triton X-100

Dos antígenos produzidos, os tratados com Triton X-100 foi considerado o com melhor linha de precipitação, onde a clareza quanto a intensidade e definição das linhas garantiram um melhor entendimento do resultado, não necessitando de repetições para confirmação do positivo. Apesar disto, este tratamento não obteve o melhor resultado em termos de sensibilidade e especificidade, o que o desqualifica dentre os tratamentos testados como melhor em termos de utilização para o diagnóstico da enfermidade. Arruda et al. (2002) recomendam a avaliação qualitativa das amostras, observando-se a formação da linha de precipitação e sua nitidez, tornando este fato como um aliado para uma leitura fidedigna das amostras. Seddon et al. (2004) relatam

que a utilização do Triton X-100 se deve ao fato de apresentar-se como um detergente não-iônico, tendo propriedades não desnaturantes e de limpeza suave, realizando a ruptura lípido-lípido e proteína-lípido, acarretando a solubilização das proteínas, não alterando a sua forma original.

Rege et al. (2002) e Neugebauer (1998), classificam o Tween 20 como um tensoativo não-iônico, que possui pouca toxicidade para as membranas biológicas e que, ao contrário de outros detergentes, não desnaturam as proteínas e são utilizados para solubilização das mesmas. Esse menor grau de desnaturação das proteínas, gerando menor modificação nas proteínas do antígeno-teste, pode explicar porque em nossos resultados o tratamento dos antígenos com Tween 20 apresentou melhor sensibilidade e especificidade do que as obtidas com o uso do Triton X-100 (Quadro 1). Neste mesmo raciocínio, Aguilar (2011), demonstra que o Tween 20 possui menos expressão inibitória que o Triton X-100 em relação à atividade metabólica das células.

Uma justificativa para a aplicação dos detergentes selecionados é a frequência com que são utilizados nos laboratórios de virologia, por serem comuns e fáceis de serem trabalhados, como citado por Lopes Junior (2011).

Torres et al. (2009) afirmam que muitas vezes o diagnóstico de animais infectados pela CAE é complexo, justo que, muitos animais mesmo sendo positivos para a enfermidade apresentam baixa titulação de anticorpos, soroconversão intermitente de soropositividade, soronegatividade ou até mesmo soroconversão tardia, fazendo-se necessário provas que apresentem alta sensibilidade. O estudo realizado mostra que a utilização de células de origem bovina, sem tratamento e tratadas com os detergentes SDS, Triton 100 e Tween 20, apresentam-se com boa sensibilidade e especificidade, contribuindo de forma positiva, podendo ser utilizados na rotina laboratorial.

CONCLUSÕES

A utilização de células de origem bovina infectadas pela amostra viral CAEV Cork tornou possível à produção de antígenos do CAEV de alta

qualidade, diminuindo os custos com insumos e simplificação no processo de purificação de proteínas. A utilização de diferentes detergentes possibilitou uma purificação das proteínas e melhoramento dos antígenos.

Declaração de interesses dos autores

Não há interesses concorrentes que tenham sido declarados.

Fonte de financiamento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, N. C. **Efeitos De Alguns Tensoativos Sobre a Viabilidade Celular De Linhagens Celulares De Câncer De Pulmão**. 2011. 78 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesq. Agr. Bras.**, v. 41, p. 1313-1319, 2006.

ARRUDA, E.; OLIVEIRA, M.; NASCIMENTO, S.; CAMPOS, A.; CASTRO, R. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 560-565, 29 set. 2011.

CALLADO, A. K. C. **Avaliação in vitro e in vivo da infecção por lentivírus de pequenos ruminantes**. Tese (Doutorado em Ciências biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

CASTRO, R. S.; GREENLAND, T.; LEITE, R. C. et al. Conserved sequence motifs involving the tatreading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis – encephalitis virus and visna – maedivirus. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 1583-1589, 1999.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; REISCHAK, D.; MOOJEN, V.; GREGORY, L.; OLIVEIRA, J. C. F.; BRGEL, E. H. Identificação imunoserológica de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos: comparação das técnicas de imunodifusão em gel de ágar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, p. 1-5, 2002.

LOPES JUNIOR, C. A. F. **Produção de Antígenos do Vírus da Artrite Encefalite Caprina para Imunodiagnóstico**. Sem Numeração. Dissertação

(Mestrado Acadêmico ou Profissional em 2011) - Universidade Estadual do Ceará, 2011.

NOGUEIRA, M. A. A. **Susceptibilidade *in vitro* de Células Bovinas a Herpesvírus Bovino e Lentivírus de Pequenos Ruminantes.** Trabalho de Conclusão de Residência (Residência Multiprofissional de Saúde) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

REGE B. D, KAO J. P., POLLI J. E. Efeitos de surfactantes não iônicos em transportadores de membrana em monocamadas de células Caco-2. **Eur J PharmSci**, v. 16, n. 4-5, p.237-46, 2002.

REISCHAK, D. Lentivírus de pequenos ruminantes: **Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos e caprinos.** 2000. 132 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membraneproteins, lipidsanddetergents: notjust a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1666, p. 105-117, 2004.

SILVA, G. R. **Análise preliminar de antígenos para lentivírus de pequenos ruminantes obtidos a partir de células de bovino.** Trabalho de Conclusão de Residência (Residência Multiprofissional de Saúde) -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.

TORRES, J. A.; CAMPOS, G. S.; FREITAS, M. M.; BRANDÃO, C. F. L.; SARDI, S. I. Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da artrite-encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, p. 107-114, 2009.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C. *et al.* Early detectionofmaedi-visna (ovineprogressive pneumonia) virusseroconversion in fieldsheep samples. **J. Vet. Diag. Investigations.**, v. 13, p. 301-307, 2001.

VESCHI, J. L. A.; CASTRO, R. S. de; NASCIMENTO, S. A. do; RAMOS, E. M.; ZAFALON, L. F. **Artrite- Encefalite Caprina (CAE): Diagnóstico Laboratorial.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Semiárido. Instruções Técnicas, 105.2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As CFBoV apresentam-se como de linhagem contínua e susceptíveis a infecção *in vitro* por lentívirus de pequenos ruminantes;

- Os tratamentos utilizados para purificação de proteínas e melhoramento dos antígenos mostrou-se eficaz para todos os três detergentes testados, mas os melhores resultados foram obtidos quando utilizado o tratamento com o SDS.

- Quando comparados ao antígeno comercial, os tratamentos com os detergentes obtiveram resultados semelhantes, mas a sensibilidade e a especificidade foram mais altas com o tratamento com o SDS.

- O uso de ferramentas biotecnológicas no melhoramento de produtos torna-se um importante aliado para diagnóstico de doenças infecciosas, aumentando a eficiência dos testes e diminuindo os custos com a realização de testes complementares, bem como com perdas no rebanho. Estes estudos também se tornam produtos interessantes podendo gerar receitas para as Universidades Federais.