

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS PROVAS DE IMUNODIFUSÃO EM PLACA E EM LÂMINA NA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA¹

MARIA IGNEZ C. FERREIRA², CARLOS H. ROMERO³ E CHERYL A. ROWE³

ABSTRACT.- Ferreira M.I.C., Romero C.H. & Rowe C.A. 1982. [A comparative study between the plate and slide immunodiffusion tests in the detection of antibodies against enzootic bovine leukosis virus.] Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placa e em lâmina na detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2(2):49-53. Embrapa - Patologia Animal, Km 47, Seropédica, RJ 23460, Brazil.

The agar gel immunodiffusion tests performed in plates and on slides were compared in their efficiency to detect antibodies against the major glycoprotein gp51 of enzootic bovine leukosis virus (BLV). Materials tested were milk, plasma and serum obtained from cattle belonging to seven dairy herds located in the States of Rio de Janeiro and São Paulo. Both tests were equally inefficient in the detection of antibodies in the milk. The plate immunodiffusion test was more sensitive than the slide test in the detection of antibodies in plasma, although, when the tests were performed with serum, both were equally sensitive in the identification of infected cattle. Out of a total of 1031 sera tested, 361 (35.0%) were identified as positive using the plate test, while the slide test detected 355 (34.4%) positives. It is concluded that the slide immunodiffusion test can efficiently substitute for the plate immunodiffusion test in the detection of antibodies against gp51 of BLV in the serum, with the additional advantage of utilizing smaller amounts of glycoprotein antigen.

INDEX TERMS: Enzootic bovine leukosis, virus, plate immunodiffusion, slide immunodiffusion.

SINOPSE.- As provas de imunodifusão em ágar gel, realizadas em placa e em lâmina, foram comparadas quanto à eficiência em detectar anticorpos contra a glicoproteína maior gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina (VLB). As amostras testadas constaram de leite, plasma e soro, obtidos de bovinos pertencentes a sete rebanhos leiteiros dos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Ambas as provas foram igualmente ineficientes na detecção de anticorpos no leite. A prova de imunodifusão em placa foi mais sensível que a prova em lâmina, na detecção de anticorpos no plasma, porém, quando as provas eram realizadas com soro, as duas eram igualmente sensíveis na identificação de bovinos infectados. De um total de 1031 soros testados, a prova em placa detectou 361 (35,0%) soros positivos enquanto a prova em lâmina 355 (34,4%). Concluiu-se que a prova em lâmina pode substituir a prova em placa eficientemente na detecção de anticorpos contra gp51 do VLB no soro, com a vantagem de utilizar menores quantidades de antígeno glicoprotéico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Leucose enzoótica bovina, vírus, imunodifusão em placa, imunodifusão em lâmina.

INTRODUÇÃO

A ocorrência de casos clínicos de leucose enzoótica bovina no Brasil (Dacorso Filho et al. 1966, Freire & Freitas 1966), tanto como a presença do agente causal, um vírus ARN de tipo C (Miller et al. 1969), são fatos bem documentados (Alencar Filho et al. 1979, Romero & Rowe 1981). O vírus da leucose bovina (VLB) está disseminado mundialmente e em geral se acha associado com o gado leiteiro de origem européia. A infecção é hoje considerada como um problema emergente de considerável importância sanitária e econômica, não só porque a presença do VLB impõe sérias restrições à exportação e importação de bovinos de alto potencial genético (Ferrer 1979), mas também devido à mortalidade que ele causa e às possíveis repercussões da infecção sobre a produtividade dos bovinos atingidos. Por estes motivos, foram desenvolvidos testes bastante sensíveis e específicos para identificar os bovinos infectados com o VLB e desta forma facilitar a erradicação da doença. Alguns destes testes são o radioimunoensaio para detectar anticorpos contra p25 (McDonald & Ferrer 1976), o teste imunossorbente ligado a enzimas também conhecido como Elisa (Todd et al. 1980) para detectar anticorpos contra gp51 e o teste de indução de sincícios para detectar o VLB (Ferrer & Diglio 1976). Porém, o teste mais extensivamente utilizado é a prova de imunodifusão em ágar gel em placa (Miller & Van Der Maaten 1977) para detectar anticorpos contra gp51, a glicoproteína maior localizada no envelope do VLB (Onuma et

¹ Aceito para publicação em 29 de dezembro de 1981.

Parte de Tese de Mestrado do primeiro autor, Curso de Pós-Graduação em Patologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

² Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

³ Unidade de Pesquisa de Patologia Animal, EMBRAPA, Km 47, Seropédica, Rio de Janeiro 23460.

al. 1975). A simplicidade da prova de imunodifusão, junto à relativa rapidez com que se obtêm os resultados (24-72 horas) sem a necessidade de utilizar equipamentos caros e sofisticados, fazem dela a prova ideal a ser aplicada em programas de controle e erradicação do VLB (Ressang 1978). O antígeno glicoprotéico gp51 é disponível comercialmente sob o nome de Leukassay-B (Pitman-Moore, New Jersey, USA) ou pode ser preparado no laboratório, com um mínimo de tecnologia, a partir de linhagens celulares persistentemente infectadas com o VLB (Van Der Maaten et al. 1974, Ferrer, comunicação pessoal). O objetivo do presente estudo foi comparar as provas de imunodifusão em ágar gel realizadas em placa e em lâmina na detecção de anticorpos específicos contra a glicoproteína gp51 do VLB. Esta última prova teria a vantagem de possibilitar maior número de testes com menores quantidades de antígeno e reativos em geral.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígeno referência do vírus da leucose enzoótica bovina.

Uma linhagem celular de rim de feto ovino (Van Der Maaten et al. 1974), persistentemente infectada com o vírus da leucose enzoótica bovina (VLB), foi utilizada para produzir o antígeno referência. As culturas foram mantidas em garrafas de Roux em uma mistura de partes iguais dos meios de cultura HAM F10 e 199, suplementados com 3% de soro bovino (livre de anticorpos contra o VLB) para crescimento e 1% para manutenção. Penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e micostatina (25 U/ml) foram também adicionados ao meio de cultura. Os fluídos celulares eram coletados entre 48 e 72 horas, conservados a 8°C até um máximo de duas semanas e concentrados 70 vezes por diálise em polietilenoglicol 6000. Esta preparação continha tanto a glicoproteína gp51 do envelope viral (Onuma et al. 1975) como o polipeptídeo estrutural p25 (Miller & Olson 1972).

Soros referência contra o vírus da leucose enzoótica bovina.

Os soros referência foram obtidos de bovinos com anticorpos tanto contra gp51 como contra p25. A especificidade das reações foi inicialmente verificada testando-se estes soros ao lado do soro de uma vaca com linfossarcoma clínico (Romero & Rowe 1981) e do soro de uma ovelha experimentalmente infectada com o VLB (Onuma et al. 1975).

Ágar gel para as provas de imunodifusão. As provas de imunodifusão foram realizadas em Ágar Difco purificado (Difco Laboratories, Detroit, USA) a 0,7% em tampão pH 7,3 contendo NaCl (85,0 g), KCl (0,2 g), Na₂HPO₄ (1,2 g), KH₂PO₄ (0,2 g), EDTA dissódico (0,372 g) e merthiolate (1:10.000) como preservativo, por litro.

Imunodifusão em placa. Foram colocados 6 ml de ágar em placas de Petri de 5 cm de diâmetro, que permaneceram armazenadas a 8°C pelo prazo máximo de uma semana antes de sua utilização. O padrão do teste era hexagonal e constituía-se de um orifício central e seis periféricos, cada um medindo 7 mm de diâmetro, equidistantes entre si (3 mm entre dois consecutivos). Em cada placa, os orifícios superior e inferior foram preenchidos com o antígeno referência e o orifício cen-

tral com o soro referência. Os quatro orifícios periféricos restantes foram preenchidos com as amostras a serem testadas. As placas foram mantidas a temperatura ambiente, observadas a cada 24 horas e a leitura final foi feita após 72 horas. O teste era considerado válido sempre que duas linhas de precipitação aparecessem entre o soro referência e cada um dos orifícios contendo o antígeno referência. As amostras em prova eram consideradas positivas quando formavam uma ou duas linhas de precipitação idênticas às linhas do soro referência (Fig. 1). A placa assim preparada era suficiente para testar quatro amostras ao mesmo tempo.

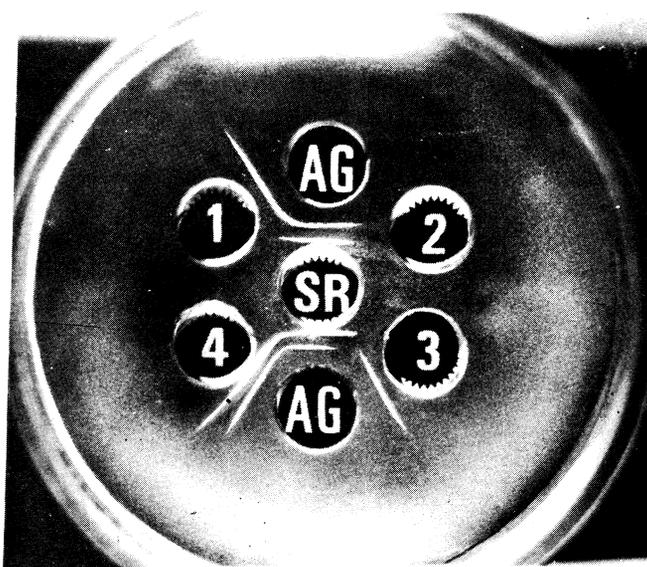


Fig. 1. A prova de imunodifusão em ágar gel realizada em placa. O orifício central contém o soro referência (SR) e os orifícios superior e inferior o antígeno referência (AG). Os quatro orifícios laterais contêm, (1) e (3), soros de bovinos com anticorpos contra gp51; (4), soro bovino com anticorpos tanto contra gp51 como contra p25, e, (2), soro de um bovino sem anticorpos contra o VLB.

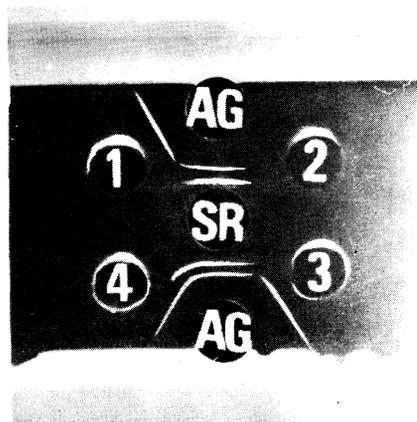


Fig. 2. A prova de imunodifusão em ágar gel realizada em lâmina. A distribuição e a reatividade dos soros e antígenos é idêntica à reação da prova em placa.

Imunodifusão em lâmina. Foram uniformemente distribuídos em seis lâminas de vidro de 75 x 25 mm, fixadas numa bandeja de imunoelctroforese, 32 ml de preparação de ágar. O padrão do teste era constituído de duas figuras hexagonais tendo cada uma delas um orifício central e seis periféricos, todos medindo 3,5 mm de diâmetro e equidistantes entre si (3,5 mm entre dois consecutivos). A disposição do antígeno referência, do soro referência e das amostras a serem testadas para presença de anticorpos contra o VLB era a mesma que para as provas em placa. A avaliação das provas em lâmina seguia as mesmas normas da prova em placa (Fig. 2). A bandeja assim preparada era suficiente para testar 48 amostras simultaneamente.

Amostras para determinação de anticorpos. Vacas mestiças holandês x zebu, com mais de quatro anos de idade, pertencentes a dois rebanhos leiteiros localizados no Estado do Rio de Janeiro (Rebanhos A e B), foram sangradas mensalmente durante seis meses consecutivos por punção da veia jugular e coleta do sangue em frascos contendo EDTA. Antes da sangria, 10 ml de leite de cada vaca eram coletados em tubos de ensaio, depois de lavar e desinfetar as tetas. A caseína foi precipitada pela adição lenta de HCl 1N, sendo o leite centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos e a camada intermediária, geralmente transparente e de pouca viscosidade, contendo as imunoglobulinas, foi transferida a um outro tubo de ensaio. O pH foi imediatamente corrigido com NaOH 1N até atingir 7,2–7,4. Bovinos de diferentes faixas etárias da raça Holandês Preto e Branco, de rebanhos leiteiros localizados nos Estados de São Paulo (Rebanhos C–E) e Rio de Janeiro (Rebanho F) foram sangrados, uma vez, por punção da veia jugular para obtenção de soro. Num outro rebanho leiteiro localizado no Estado do Rio de Janeiro (Rebanho G), bezerros da raça Holandês Preto e Branco foram sangrados mensalmente durante 12 a 19 meses por punção da veia jugular também para obtenção de soro. Tanto o plasma quanto o leite e o soro coletados foram conge-

lados a -20°C antes da pesquisa de anticorpos contra gp51 do VLB nas provas de imunodifusão em placa e em lâmina.

RESULTADOS

As provas de imunodifusão em placa e em lâmina não detectaram anticorpos contra gp51 do VLB em 15 amostras de plasma e 15 amostras de leite obtidas de três vacas negativas do rebanho A, durante seis meses consecutivos. Por outro lado, de 92 plasmas correspondentes a 17 vacas infectadas do mesmo rebanho, 90 (97,8%) possuíam anticorpos detectáveis pela prova em placa enquanto que a prova em lâmina revelou anticorpos em apenas 70 (76,1%) plasmas. Em oito (8,4%) das 95 amostras de leite das 17 vacas infectadas foi possível evidenciar anticorpos pela prova em placa enquanto que a prova em lâmina não detectou anticorpos em nenhuma delas. (Quadro 1)

No rebanho B, ambas as provas revelaram anticorpos em 1 (1,2%) de 82 plasmas correspondentes a 14 vacas negativas. O leite destas vacas não continha anticorpos detectáveis por ambas as provas de imunodifusão. De 116 plasmas, correspondentes a 21 vacas positivas deste rebanho, 115 (99,1%) possuíam anticorpos demonstráveis pela prova em placa enquanto que 106 (94,6%) de 112 provas realizadas revelaram os mesmos anticorpos na prova em lâmina. Das 118 amostras de leite coletadas destas vacas, em duas (1,7%) foi demonstrada a presença de anticorpos na prova em placa e em uma (0,9%) na prova em lâmina. (Quadro 1)

Quando as duas provas de imunodifusão foram utilizadas para detectar anticorpos no soro de bovinos dos rebanhos C, D, E, F e G, a prova em placa detectou 48,8, 72,2, 73,1, 41,7 e 13,3% de soros positivos enquanto que a prova em lâmina revelou 47,6, 72,8, 71,2, 33,3 e 13,3% de soros positivos respectivamente (Quadro 2). Dos 1031 soros testados, a prova em placa acusou 361 (35,0%) positivos e a prova em lâmina, 355 (34,4%).

Quadro 1. Detecção de anticorpos contra gp51 do VLB no plasma e leite de vacas, durante um período de 6 meses, utilizando-se simultaneamente as provas de imunodifusão em placa e em lâmina

Rebanhos	Nº de bovinos	Estado sorológico inicial (a)	Imunodifusão	Anticorpos contra gp51 do VLB	
				Plasma	Leite
A	3	–	Placa	0/15 (0,0) (b)	0/15 (0,0)
		–	Lâmina	0/15 (0,0)	0/15 (0,0)
	17	+	Placa	90/92 (97,8)	8/95 (8,4)
		+	Lâmina	70/92 (76,1)	0/95 (0,0)
B	14	–	Placa	1/82 (1,2)	0/80 (0,0)
		–	Lâmina	1/82 (1,2)	0/80 (0,0)
	21	+	Placa	115/116(99,1)	2/118(1,7)
		+	Lâmina	106/112(94,6)	1/118(0,9)

(a) Sem anticorpos (–) ou com anticorpos (+) no soro detectáveis na prova em placa no primeiro mês de experimentação.

(b) Número de plasmas ou leites com anticorpos/Número de plasmas ou leites testados (percentagem com anticorpos).

Quadro 2. Detecção de anticorpos contra gp51 do VLB no soro de bovinos de diferentes idades utilizando-se simultaneamente as provas de imunodifusão em placa e em lâmina

Rebanhos	Imunodifusão	Idade em meses							Total
		0-3	4-6	7-12	13-18	19-30	31-48	49+	
C	Placa	9/13	1/7	8/54	9/29	13/58	12/16	62/69	120/246 (48,8)
	Lâmina	9/13	1/7	8/54	9/29	17/58	12/16	61/69	117/246 (47,6)
D	Placa	5/11	0/3	1/22	5/11	32/36	28/28	46/51	117/162 (72,2)
	Lâmina	5/11	0/3	1/22	5/11	33/36	28/28	46/51	118/162 (72,8)
E	Placa	-	-	-	-	3/5	1/2	34/45	38/52 (73,1)
	Lâmina	-	-	-	-	3/5	1/2	33/45	37/52 (71,2)
F	Placa	-	0/7	-	-	-	-	15/27	15/36 (41,7)
	Lâmina	-	0/7	-	-	-	-	12/29	12/36 (33,3)
G	Placa	28/122	17/142	19/200	6/57	1/14	-	-	71/535 (13,3)
	Lâmina	29/122	16/142	19/200	6/57	1/14	-	-	71/535 (13,3)

^a Número de soros com anticorpos/Número de soros testados (percentagem com anticorpos).

DISCUSSÃO

A prova de imunodifusão em ágar gel realizada em placa para detectar anticorpos específicos no soro contra a glicoproteína maior gp51 do VLB vem sendo utilizada desde 1975 como evidência de infecção com este vírus, tanto em programas de erradicação (Van Der Maaten, comunicação pessoal) como no teste de bovinos para exportação (Miller 1980). A prova de imunodifusão tem sido comparada, no referente à sua eficiência e funcionalidade, a outras técnicas sorológicas modernas altamente sensíveis tais como o radioimunoensaio (Miller et al. 1981) e o teste de Elisa (Todd et al. 1980). Apesar de alguns soros serem positivos no radioimunoensaio num momento em que a prova de imunodifusão ainda é negativa, a soroconversão nesta última acontece aproximadamente 10 dias depois (Miller et al. 1981). Uma limitação na utilização do radioimunoensaio é a necessidade de dispor de um contador gamma e de antígenos altamente purificados, marcados com elementos radioativos, os quais não são de fácil obtenção em nosso meio. A prova de imunodifusão tem a grande vantagem de ser simples, barata, dispensar equipamento especial e de poder ser realizada com antígenos relativamente impuros. Quando comparada com o teste de Elisa, a prova de imunodifusão é quase tão sensível quanto ela, tendo a vantagem de não necessitar de um espectrofotômetro para determinar a absorvância das reações.

Apesar de a prova de imunodifusão ser relativamente simples e de fácil utilização, sua aplicação tem sido limitada, no Brasil, devido à importação do antígeno a preço demasiado oneroso, dificultando a sua utilização extensiva, tanto em levantamentos soro-epidemiológicos como em programas de controle do VLB. Embora este antígeno esteja sendo preparado atualmente em nossos laboratórios, a partir de linhagens celulares persistentemente infectadas com o VLB, os meios de cultura empregados são ainda de alto custo. Diante disso, decidimos

avaliar a microprova de imunodifusão realizada em lâminas, visando a substituir a prova em placa. Os resultados das provas realizadas com amostras dos rebanhos A e B indicam que ambas as provas de imunodifusão são ineficientes na detecção de anticorpos contra gp51 no leite de vacas infectadas e que possuíam anticorpos no soro revelados por ambas as provas. Por outro lado, na pesquisa de anticorpos no plasma, a prova em placa foi visivelmente superior à prova em lâmina. No presente resultado houve discrepância quanto à eficiência entre as duas provas, sem uma razão plausível. Flensburg & Streiffert (1977), no entanto, fazem referência à influência negativa do congelamento e recomendam apenas a refrigeração do plasma para obter melhores resultados. Os plasmas e soros trabalhados por nós sempre foram congelados a -20°C antes dos testes. Admite-se portanto que, nesta circunstância, o congelamento dos plasmas deva ter interferido para a menor eficiência. Além disso, na prova de imunodifusão em lâmina utilizam-se quantidades de reagentes cinco vezes menores do que as empregadas no teste da placa. Quando ambas as provas foram utilizadas para detectar anticorpos no soro de 1031 bovinos dos rebanhos C-G, a prova em placa revelou 361 (35,0%) soros positivos enquanto a prova em lâmina detectava 355 (34,4%), demonstrando-se assim a boa correlação entre ambas as provas e a possibilidade de vir a prova em lâmina a substituir a prova em placa. Os cinco resultados discordantes, positivos na prova em placa e negativos na prova em lâmina, devem-se a soros com menor quantidade de anticorpos, evidenciados por reações tênues, caracterizadas por linhas de precipitação fracas. Os resultados das provas de imunodifusão com soros de bovinos dos rebanhos C-F confirmaram a presença da infecção com o VLB em rebanhos leiteiros tanto no Estado do Rio de Janeiro (Romero & Rowe 1981) como em São Paulo (Alencar Filho et al. 1979).

Conclui-se que a prova em lâmina pode substituir eficientemente a prova em placa na detecção de anticorpos contra gp51

do VLB no soro sanguíneo, com a vantagem de ser mais econômica.

Agradecimentos.- Agradecemos ao Sr. Geraldo Baêta da Cruz pela excelente assistência técnica prestada, ao Dr. Gonzalo E. Moya pelas fotografias das provas de imunodifusão, à Sra M. Lucia P. Silva e ao Dr. Jerome Langenegger pela preparação e revisão deste manuscrito, respectivamente. O presente trabalho contou com o auxílio financeiro (N.º 222.1690/77) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

REFERÊNCIAS

- Alencar Filho R.A., Mazanti M.T., Saad A.D. & Pohl R. 1979. Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (L.L.C.) dos bovinos no Estado de São Paulo. *Biológico*, S. Paulo, 45:47-54.
- Dacorso Filho P., Langenegger J., Faria J.F. & Aguiar A.A. 1966. Casos de leucose bovina no Estado do Rio de Janeiro. *Veterinária*, Brasil, 19:44-54.
- Ferrer J.F. 1979. Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 175:1281-1286.
- Ferrer J.F. & Diglio C.A. 1976. Development of an *in vitro* infectivity assay for the C-type bovine leukemia virus. *Cancer Res.* 36:1068-1073.
- Flensburg J.C. & Streyffert B. 1977. The control of bovine leukosis in Denmark. Epidemiologic and diagnostic aspects. *Nord. Vet. Med.* 29:49-67.
- Freire M.H.R. & Freitas V.M. 1966. Constation de la leucose bovina dans l'État de Rio de Janeiro, Brésil. *Bull. Off. Int. Épiz.* 66:775-782.
- McDonald H.C. & Ferrer J.F. 1976. Detection, quantitation and characterization of the internal viral antigen of the bovine leukemia virus by radioimmunoassay. *J. Natl Cancer Inst.* 57:875-882.
- Miller L.D. 1980. Export testing for enzootic bovine leukosis. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 177:620-622.
- Miller J.M., Miller L.D., Olson C. & Gillete K.G. 1969. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl Cancer Inst.* 43:1297-1305.
- Miller J.M. & Olson C. 1972. Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. *J. Natl Cancer Inst.* 49:1459-1462.
- Miller J.M., Schmerr M.J.F. & Van Der Maaten M.J. 1981. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:5-8.
- Miller J.M. & Van Der Maaten M.J. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer* 13:1369-1379.
- Onuma M., Olson C., Baumgartener L.E. & Pearson L.D. 1975. An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *J. Natl Cancer Inst.* 55:1155-1158.
- Ressang A.A. (ed.) 1978. The serological diagnosis of enzootic bovine leukosis. Commission of the European Communities, Scientific and Technical Information and Information Management, Batiment Jean Monnet, Luxembourg. (Citado por Ferrer 1979)
- Romero C.H. & Rowe C.A. 1981. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 13:107-111.
- Todd D., Adair B.M. & Wibberley G. 1980. An enzyme-linked immunosorbent assay for enzootic bovine leukosis virus antibodies. *Vet. Rec.* 107:124-126.
- Van Der Maaten M.J., Miller J.M. & Boothe A.D. 1974. Replicating Type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissues from cattle with lymphosarcoma. *J. Natl Cancer Inst.* 52:491-497.