DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE ANIMAIS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA

Rafaela Machado Flor[1], Anthony Broering Ferreira[2], Ubirajara Maciel da Costa[3].

[1]Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária - CAV – bolsista PIVIC.
[2]Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária - CAV.
[3]Orientador, Departamento de Medicina Veterinária - CAV- ubirajara.costa@udesc.br.

Palavras-chave: BLV, Bovinos, ELISA, Diagnóstico, Vírus.

O Vírus da Leucose Bovina ou Bovine Leukemia Virus (BLV) pertencente à família *Retroviridae* e ao gênero *Deltaretrovirus* está distribuído mundialmente. Infecta bovinos, gerando perdas econômicas substanciais, principalmente em bovinos de leite. Este vírus possui genoma constituído por duas moléculas de RNA fita simples de polaridade positiva, é envelopado e apresenta a enzima transcriptase reversa. O vírus da leucose bovina foi primeiramente identificado no Brasil em 1943, advindo acredita-se que da importação de animais oriundos de países como Estados Unidos, Canadá e Uruguai (MORAES et al., 1996), tendo a disseminação pelo país favorecida pela ausência de políticas sanitárias de controle e erradicação. A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) pode se apresentar, principalmente, de duas formas: pelo desenvolvimento de linfocitose persistente (LP) em cerca de 30% dos animais infectados, ou pelo desenvolvimento de linfossarcomas, sendo essa forma presente em 2 a 5% dos infectados (LEUZZI JR. et al., 2001; RAJÃO, 2008). O desenvolvimento dos tumores culmina com curso fatal de 3 a 6 meses após início dos sinais clínicos, sendo os principais órgãos afetados os linfonodos, além de menos comumente o abomaso, coração, útero, tecido periorbital e medula espinhal.

A transmissão do vírus ocorre principalmente pela transferência de linfócitos infectados. Na forma vertical, mais expressivamente pela ingestão de colostro e leite, e não tão significantemente por via uterina (cerca de 3 a 5%) (JACOBSEN et al., 1983); e de forma horizontal sendo essa forma a responsável pela maior parte das infecções. A transmissão horizontal pode ocorrer principalmente através de iatrogenia (descorna, tatuagem, vacinação, coleta de sangue, palpação retal), contato direto e indireto entre animais (secreções e excreções), e através de vetores, destacando os tabanídeos (MANET et al., 1989).

O diagnóstico da LEB pode ser feito através da observação dos sinais clínicos, porém esse é bastante presuntivo, ou ainda por diagnóstico histopatológico utilizando fragmentos de órgãos afetados (LUDERS, 2001). Os métodos sorológicos são considerados principais, pois são importantes para a identificação de bovinos infectados com o BLV independente da forma ou intensidade de manifestação clínica, sendo as técnicas mais utilizadas a Imunodifusão em Agar Gel (IDAG), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o radioimunoensaio (RIA).

O objetivo do presente trabalho consiste em desenvolver um kit para ensaio imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico sorológico de rebanhos infectados pelo BLV.

As amostras de sangue utilizadas para extração do vírus foram obtidas através de coleta a vácuo da veia caudal ou jugular de bovinos leiteiros da raça Holandesa, foram coletadas amostras com e sem anticoagulante. As amostras com anticoagulante foram centrifugadas para obtenção da camada leucocitária, essa foi aspirada e acondicionada em microtubos de 1,5 a 2 mL. Uma parte destes

foram utilizados para confirmação da presença dos vírus na amostra por teste de PCR e outra parte utilizadas para o isolamento viral em cultivo de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). Estas células eram mantidas em garrafas de cultivo de 25 cm^2 em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37 ºC e 20 % de CO_2 em ar. Para o isolamento viral, quando as células atingiram confluência em torno de 70 % foram adicionados os leucócitos do animal positivos para o BLV, mantendo contato durante uma hora em estufa, sendo então removido o inóculo e as células postas novamente em cultivo com DMEM suplementado com 2% de SFB. Os cultivos foram observados diariamente em microscópio invertido para constatação do efeito citopatogenico viral (sincício). As placas a serem desenvolvidas serão sensibilizadas com a amostra viral previamente obtida, titulada e diluída. Será realizado o bloqueio da placa com albumina sérica bovina evitando ligações inespecíficas, e os antígenos adsorvidos serão testados utilizando amostras de animais confirmadamente positivos e negativos para o BLV e também positivos para outras enfermidades virais relevantes. Como marcador para o teste de ELISA serão utilizados anticorpos comerciais anti-IgG bovina ligados à enzima peroxidase. Para validação do teste será utilizado o kit ELISA CHEKIT-Leucose-serum produzido pelo laboratório IDEXX®, além de que serão estipulados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo.