

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

Anthony Broering Ferreira<sup>1</sup>, Ubirajara Maciel da Costa<sup>2</sup>, Rafaela Machado Flor<sup>3</sup>, Maiara Araujo Branco<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária (CAV) – bolsista PROBIC/UDESC.

<sup>2</sup> Orientador, Departamento de Medicina Veterinária (CAV) ubirajara.costa@udesc.br.

<sup>3</sup> Acadêmicas do Curso de Medicina Veterinária (CAV)

O Vírus da Leucose Bovina ou Bovine Leukemia Virus (BLV) pertencente à família *Retroviridae* e ao gênero *Deltaretrovirus* está distribuído mundialmente e causa Leucose Enzoótica Bovina (LEB). 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. A 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).

A transmissão do vírus ocorre principalmente pela transferência de linfócitos infectados. Na forma vertical, mais expressivamente pela ingestão de colostro e leite, e menos significativamente 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 (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).

Para o diagnóstico, os métodos sorológicos são considerados os 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) e o ensaio imunoenzimático.

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, esta foi aspirada e acondicionada em microtubos de 1,5 mL. Uma parte destes foi utilizada para confirmação da presença dos vírus na amostra por teste de PCR e a outra parte, para o isolamento viral em cultivo de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney). Quanto ao PCR, pós terminada a extração do DNA proviral através do Tri-Reagente, este foi submetido a amplificação em termociclador Biocycler® MJ96+(Biosystems) utilizando-se o mix de reação composto de 20µL do PCR Master Mix® (Quatro G Ltda., Porto Alegre, Brasil) e 1µL de cada *primer* OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') e OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3') e 3 µL da amostra sendo o volume final de reação de 25 µL. As condições de reação foram de cinco minutos a temperatura de 94°C, seguido

de cinco ciclos a 94°C por 45 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos, sendo em seguida realizados mais 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 59°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos. Por fim, um ciclo a 72 °C por sete minutos. O fragmento amplificado foi de 440 pb do gene *env* referente a posição 5029 – 5468 do genoma viral. O produto da amplificação foi então analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% preparado em solução TAE 1X. Foi plotado 9µL de produto amplificado e 1µL de loading. Em seguida realizou-se eletroforese por aproximadamente 1 hora, a uma voltagem de 100v e a uma amperagem de 400 mA. Após esse processo, o gel foi corado com GelRed® e realizou-se a leitura em transluminador. Para o isolamento viral, as células MDBK eram mantidas em garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> em ar. Quando as células atingiram confluência em torno de 70 %, adicionaram-se os leucócitos do animal positivos para o BLV, mantendo contato durante uma hora em estufa, posteriormente, foi 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). Após algumas passagens, observou-se contaminação bacteriana dessas amostras celulares. Como medida de solução, coletou-se tecido vivo de um bezerro possivelmente contaminado por BLV, onde foi realizada tricotomia de uma área de 1,0 cm<sup>2</sup> na orelha esquerda do bezerro e feito um bloqueio periférico com lidocaína 2% sem vasoconstrictor. Em seguida, foi coletado o tecido com um alicate mossador. Este tecido foi colocado em um meio com DMEM e uma concentração de 10x ampicilina e gentamicina para ser transportado para o laboratório. Posteriormente, foi feito o processamento desse material em meio estéril de modo que ficasse em pequenos fragmentos (explantes) para o desprendimento das células do animal. Estes fragmentos foram colocados em três garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> em ar. Quando essas células formaram um tapete celular no fundo da garrafa, foi selecionada uma das garrafas e foi coletado o material genético. Doravante seriam realizados os testes de PCR para certificar a presença do vírus nas células, porém o projeto foi interrompido devido à pandemia.

Após a obtenção do vírus, placas de 96 poços serão sensibilizadas com a amostra viral, titulada e diluída. Será realizado o bloqueio da placa com albumina sérica bovina evitando ligações inespecíficas e os antígenos adsorvidos serão testados utilizando soro de animais previamente testados positivos e negativos para o BLV, e também positivos para outras enfermidades virais relevantes. Como anticorpo secundário 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.

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