



## **DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA IMUNOENZIMÁTICA ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE BOUBA AVIÁRIA**

**NUNES, Cristina Freitas; CASTRO, Clarissa Caetano de; VILELA, Camila de Oliveira; MUNHOZ, Livia Silveira; FINGER, Paula Fonseca; SIEDLER, Bianca Sica; SILVA, Luis Gustavo Crochemore; VARGAS, Gilberto D´Avila; FISCHER, Geferson; HÜBNER, Silvia de Oliveira.**

*Laboratório de Virologia e Imunologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. [tinavet@hotmail.com](mailto:tinavet@hotmail.com)*

### **1. INTRODUÇÃO**

A Boubá Aviária é causada por um poxvírus, do gênero *Avipoxvirus* (*Fowl poxvirus* – FPV). A maioria dos poxvírus aviários é espécie-específica, mas alguns são capazes de serem transmitidos para aves de diferentes espécies, gêneros e até famílias (Ritchie *et al*, 1994). Já foram detectados em galináceos, passeriformes, pombos, psitacídeos, anatídeos, rapinantes e ratitas e têm recebido denominação relacionada com os seus hospedeiros. São diferenciados pelo espectro de hospedeiros e pela formação diferencial de lesões em cultivos de fibroblasto de embriões de galinha (FEG) e na membrana corioalantóide de ovos embrionados. A patogenicidade difere de acordo com as aves acometidas. A transmissão ocorre pela picada de insetos sugadores ou pelo contato com alimentos, água, secreções e fômites contaminados. O vírus não passa pela pele intacta e requer cortes ou abrasões na pele ou mucosa para infectar. A doença pode manifestar-se de três formas: cutânea, septicêmica e diftérica, conforme a virulência da cepa, distribuição das lesões e a susceptibilidade da ave (Cubas & Godoy, 2004). O ambiente em que o animal vive e o estresse contínuo pode contribuir para a ativação do vírus latente e também para o aumento da patogenicidade da doença, que parece ser autolimitante nas aves de vida livre. Segundo Lüscho *et al* (2004) em aves domésticas e silvestres a forma clínica mais freqüente é caracterizada por lesões cutâneas e raramente atingem a boca e o trato respiratório superior (forma diftérica). No estudo de Weli *et al* (2004) 60 espécies de aves de vida livre, representando 20 famílias, já foram identificadas como suscetíveis ao poxvírus aviário. Embora a doença seja controlada por vacinas em criações comerciais de galinhas e

perus, ainda é considerada economicamente expressiva em algumas regiões (Lüschoew *et al*, 2004).

O FPV está distribuído mundialmente e as suas infecções têm sido descritas há séculos. Criações de galinhas, perus e pombos podem sofrer perdas consideráveis em algumas épocas do ano, geralmente relacionadas com a presença de um maior número de vetores transmissores do agente. É um vírus de importância na avicultura industrial, podendo causar perdas por queda na produção de ovos, perda de peso e mortalidade. Por isso, se faz necessário o controle e diagnóstico dessa doença (Wageck, 2007). São utilizadas as técnicas de soro-neutralização, imunodifusão, imunofluorescência, hemaglutinação passiva, imunoblotting e ELISA para demonstrar exposição ao FPV (OIE, 2000). Como geralmente o teste ELISA possui uma alta sensibilidade e reprodutibilidade, tornou-se o método de escolha para a análise de um grande número de amostras. Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e a padronização de um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto) para a pesquisa de anticorpos contra o poxvírus aviário, utilizando uma cepa vacinal como antígeno para posteriormente ser aplicado a Pingüins-de-Magalhães.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi desenvolvida e padronizada a técnica de ELISA conforme IRITANI & SAWAGUCHI, (1994) com pequenas modificações. FEG foram multiplicados em meio essencial mínimo de Eagle (E-MEM) suplementado com 10 % de soro fetal e enrofloxacina (10 mg/L). O cultivo foi inoculado com um FPV vacinal (cepa suave) e coletado 48h após a inoculação. Células e sobrenadantes foram congelados a -70°C e centrifugados a 3000xg por 20 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado por 2h a 70000xg a 4°C. O sedimento formado foi ressuspenso em Tris-HCl 1mM (pH 7.2), e foi utilizado como antígeno para sensibilização de placas de ELISA. O mesmo procedimento foi realizado com FEG em que não foi inoculado o FPV (antígeno celular). Os antígenos foram fracionados e armazenados a -70°C até o momento do uso.

Para a análise da presença de anticorpos contra a Boubá Aviária foram utilizadas amostras de soro de galinhas vacinadas e "Specific Patogenic Free" (SPF), como controles positivos e negativos, respectivamente. Sensibilizou-se três microplacas com 100µl por poço do antígeno diluído em tampão carbonato (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.5) e foi feita incubação *overnight* a 4°C. As placas foram testadas segundo a técnica descrita por IRITANI & SAWAGUCHI (1994) sendo os soros analisados em duplicata. A leitura das placas foi realizada em equipamento TermoPlate, em um comprimento de onda de 492nm. A densidade óptica (DO) de cada amostra foi ajustada pela obtenção da média das amostras em duplicata e posterior subtração da absorvância do antígeno celular.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ELISA foi padronizado de forma a obtenção da maior diferença entre a DO dos soros positivos e negativos. Para tal, a concentração ótima do antígeno foi de 1:200 do volume inicial, sendo a diluição do soro de 1:50. Os valores de absorvância

obtidos com o teste ELISA indireto, utilizando a cepa suave de poxvírus purificado, nas amostras de soros de aves imunizadas, variaram aproximadamente entre 0,233 e 0,504. Nas amostras de soros de aves SPF, verificaram-se valores de absorvância variáveis, aproximadamente entre 0,057 a 0,134. Foram considerados como soros positivos aqueles que apresentaram DO duas vezes maior que a DO do soro controle negativo (SPF), confirmando assim a eficácia do teste.

#### 4. CONCLUSÃO

O protocolo utilizado para o desenvolvimento do ELISA indireto foi capaz de diferenciar os animais imunizados (presença de anticorpos) dos não imunizados (ausência de anticorpos). Assim, posteriormente este protocolo será realizado para verificar se há presença ou não de anticorpos contra o poxvirus aviário em Pinguins-de-Magalhães.

#### 8. AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por terem financiado parcialmente este trabalho através da concessão de bolsas de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da UFPel e Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária - UFPel.

#### 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CUBAS, Z. S.; GODOY, S. N. **Algumas doenças de aves ornamentais**. Capturado em 8 de agosto 2009. *On line*. Disponível na internet <http://www.abma.com.br/2004/notes/207.pdf>, 2004

IRITANI, Y.; SAWAGUCHI, K. Measurement of Antibody Titer to Fowl Pox Virus by Enzyme-Linked immunosorbent Assay. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v 56 n.6 p.1191-1193, 1994

LÜSCHOW, D.; HOFFMANN T.; HAFEZ H. M. Differentiation of avian poxvirus strains on the basis of nucleotide sequences of 4b gene fragment. **Avian Diseases**, v.48, p.453–462, 2004.

RITCHIE, B.W., HARRISON, G.J., HARRISON, L.R. **Avian Medicine: principles and application**. Florida: Winger. Capturado em 9 de agosto 2009. *On line*. Disponível na Internet <http://www.avianmedicine.net/ampa/32.pdf>, 1994.

WAGECK C.C. in: FLORES, E. F. Poxviridae. **Virologia Veterinária**, cap. 18 p. 504-505, ed. UFSM, Santa Maria, 2007.

WELI, S. C., OKEKE, M.I., TRYLAND, M., NILSSEN, O., TRAAVIK, T. Characterization of avipoxviruses from wild birds in Norway. **The Canadian Journal of Veterinary Research** v. 68, p.140-145, 2004.