

SEÇÃO: Oral

ÁREA: Veterinária e afins

NÍVEL DO CURSO: Ensino Superior

Otimização de um ELISA indireto para detecção de anticorpos séricos contra o vírus da Leucose Bovina.

Adriana Carla Balbinot, Caroline Tochetto, Eloise Claudia Parise, Keila Catarina Prior, Melani Auler Arce, Talita Carina Bogoni, Diogenes Dezen
Instituto Federal Catarinense - Câmpus Concórdia
Medicina Veterinária
E-mail de contato: diogenes.dezen@ifc-concordia.edu.br

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade viral crônica causada pelo Vírus da Leucose Bovina (VLB), a qual acomete principalmente bovinos entre três a oito anos de idade, determinando uma doença com caráter neoplásico em linfonodos periféricos ou órgãos internos e com sinais clínicos pouco definidos. Uma vez que o animal é infectado pelo vírus, o mesmo se torna portador, já que o VLB se integra ao genoma do hospedeiro. A Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é o método padrão para detecção de animais portadores, a qual é baseada na identificação de anticorpos específicos contra os antígenos do VLB. Contudo o método apresenta algumas limitações em relação aos ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA, tais como: menor sensibilidade e maior tempo para execução da prova (até 72 h). Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e padronização do método ELISA, a fim de detectar e quantificar os anticorpos séricos contra o VLB. Para o teste de ELISA foram otimizadas variáveis como diluições de antígeno (Ag) e do soro primário (Ac) utilizando planejamento fatorial 2 em duplicata, com 2 variáveis (Ag e Ac) em doze e quatro níveis de variação, respectivamente. Os níveis de variação para Ag foram diluições de 1:10 a 1:20480; já os níveis de variação utilizados para o Ac foram diluições de 1:5 a 1:40. Em placas de 96 orifícios com fundo plano foram adicionados, por orifício, 100 μ L do antígeno diluído. O antígeno, o VLB, foi obtido comercialmente (TECPAR) na forma liofilizada, ressuspendido, conforme instruções do fabricante, e diluído em tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18-24 horas. Após a adsorção do antígeno, realizou-se cinco lavagens com tampão fosfato, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7,4. O soro controle positivo (SCP) e soro controle negativo (SCN) foram diluídos em PBS-T, adicionados em duplicata na placa e incubados por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Depois de realizadas três lavagens foi adicionado em cada orifício 100 μ L do soro contra IgG bovina conjugado com peroxidase, na diluição 1:10.000. Após a incubação em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, a placa foi lavada, seguida de adição de 100 μ L/orifício do revelador (TMB), incubação por 10 minutos em temperatura ambiente e bloqueio da

reação através do acréscimo de 50 μ L de solução contendo ácido sulfúrico. A densidade ótica (OD) foi lida em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. As diluições otimizadas foram determinadas a partir do maior valor obtido da relação da OD do SCP/OD do SCN, as quais foram: diluição 1:320 do antígeno e diluição 1:40 do soro. No processo de otimização do ELISA, as variáveis podem sofrer influência mútua e o valor ideal pode depender da interação entre estas variáveis, portanto este procedimento inicial é primordial para o desenvolvimento do ELISA. Entretanto, ainda é necessária a validação do teste, para que se possa diferenciar animais soropositivos de animais soronegativos, procedimento este que se encontra em fase de andamento no nosso laboratório.

Palavras-chave: Leucose enzoótica bovina. ELISA indireto. Otimização.