

AVALIAÇÃO DO USO DE SANGUE EM PAPEL-FILTRO PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS PARA O VÍRUS DA DOENÇA DE NEWCASTLE

FABIANE FONSECA,¹ SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER,² GILBERTO D'AVILA VARGAS,² GEFERSON FISCHER³ E TELMO VIDOR²

1. Médica veterinária, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPe)
2. Professores do Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Virologia e Imunologia, UFPe, Caixa Postal 356, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. *E-mail: sohübner@yahoo.com.br
3. Doutorando em Biotecnologia Agrícola, UFPe.

RESUMO

O presente trabalho descreve a utilização de sangue total em papel-filtro para avaliação dos níveis de anticorpos específicos contra o vírus da doença de Newcastle (NDV) através da técnica de inibição da hemaglutinação (HI). Coletaram-se e analisaram-se por HI amostras de sangue de noventa e oito galinhas, com um histórico conhecido de vacinação contra o NDV HI. O sangue foi impregnado em papel-filtro Wathman n° 1 com 3cm² e também coletado em tubos para a obtenção de soro. Armazenaram-se os papéis à temperatura ambiente e procedeu-se a sua análise num período de até quarenta e cinco dias. A sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo

negativo do HI mediante o uso de papel-filtro, comparado com o HI em que se utilizou soro, foram de 89%, 73%, 76% e 87 %, respectivamente. Detectaram-se um índice de precisão de 80% e um coeficiente de correlação $r = 0,81\%$. O título médio geométrico de anticorpos foi 33,1% e 33,6 para eluídos de papel-filtro e os soros, respectivamente. A associação entre os dois métodos foi altamente significativa ($p < 0.001$) quando analisada pelo teste de Fisher. Os resultados indicam o potencial da utilização do sangue em papel-filtro como uma alternativa ao soro para detecção de anticorpos contra o NDV.

PALAVRAS-CHAVES: Galinha, inibição da hemaglutinação, sorologia.

ABSTRACT

EVALUATION OF BLOOD ON FILTER PAPER TO DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE ANTIBODIES TO NEWCASTLE DISEASE VIRUS

The present study describes the evaluation of a filter paper blood sampling technique for assessment of the level of antibodies against the Newcastle disease virus (NDV) by hemagglutination inhibition (HI) test. Blood samples were collected from ninety eight chickens with a known history of vaccination against NDV and analyzed by HI method. The blood was impregnated onto Whatman no. 1 filter paper with 3cm² and also collected in tubes for obtaining serum. The papers were stored at room temperature and tested within forty five days. The resulting sensitivity, specificity,

positive predictive value and negative predictive value of the filter paper HI compared to serum HI was 89%, 73%, 76% and 87%, respectively. It was found index precision of the 80% and the correlation coefficient $r = 0.81\%$. The overall average geometrical titer of antibodies was 33.1 and 33.6 in eluates and in sera, respectively. Association between the two methods was found to be highly significant ($p < 0.001$) when analyzed by Fishers test. The results indicate the potential use of filter paper blood sampling technique as an alternative to serum for detection of the antibodies against NDV.

KEY-WORDS: Chicken, hemagglutination inhibition, serology.

INTRODUÇÃO

A doença de Newcastle (ND) é considerada uma das infecções virais mais contagiosas, espalhando-se rapidamente entre as aves suscetíveis (MURPHY et al., 1999). Possui grande importância econômica, uma vez que eleva significativamente os índices de mortalidade, além de acarretar uma diminuição acentuada dos índices produtivos de poedeiras comerciais (FRIEND & FRANSON, 1999). Mais de 230 espécies de aves já foram identificadas como suscetíveis à infecção natural ou experimental pelo vírus da doença de Newcastle (NDV), acarretando a necessidade de uma contínua vigilância epidemiológica. A ND é uma enfermidade de notificação obrigatória à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE – Office International des Epizootie) e controlada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil.

O plano nacional de controle e prevenção da doença de Newcastle prevê a realização de contínuo monitoramento sorológico pelos laboratórios credenciados. A determinação da presença de anticorpos específicos para o NDV, geralmente, é realizada através do teste de inibição da hemaglutinação (HI), por ser bastante sensível, simples, rápido, e não requerer equipamentos sofisticados. Porém, um monitoramento sorológico em grande escala é dificultado, em razão de problemas associados à coleta, estoque e transporte das amostras de soro aos laboratórios.

Alguns trabalhos relataram a simplicidade da amostragem de sangue total em papel-filtro para avaliação da presença de anticorpos contra algumas infecções virais (PUNNARUGSA & MUNGMEE, 1991; ROY et al., 1997; THANGAVELU et al., 2000; HOGREFE et al., 2002; CHAKRAVARTIA et al., 2003). A performance dos estudos que utilizam amostras de soro provenientes de aves pode ser melhorada, se amostras de sangue total impregnadas em papel-filtro apresentarem resultados compatíveis com aqueles obtidos nos ensaios sorológicos recomendados. Ressalta-se ainda que as amostras de sangue em papel-filtro podem ser secas em temperatura ambiente, não necessitam refrigeração, ocupam

pouco espaço, podem ser facilmente transportadas e também utilizadas em locais onde há escassos recursos laboratoriais. O presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a possibilidade do uso de amostragem de sangue de galinhas em papel-filtro para detectar e avaliar níveis de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o NDV.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e amostras de sangue

O estudo incluiu noventa e oito galinhas comerciais de postura, as quais tinham sido imunizadas para o NDV nas semanas um (cepa B1), cinco, dez, quinze, trinta e quarenta e cinco (cepa La Sota), após o nascimento. Obteve-se o sangue da veia jugular e, após a coagulação, parte foi centrifugada a 300 x g durante dez minutos, para a obtenção de soro, as quais foram estocadas a -20°C até o momento da realização dos testes. A outra parte do sangue obtido impregnou-se em 3 cm² de papel-filtro (Whatmann nº 1), o correspondente a um volume aproximado de 150 µL de sangue. Secou-se o sangue no papel-filtro a 20°C por vinte e quatro horas, após o que os papéis foram embalados em sacos de papel e armazenados em temperatura ambiente até a fase de eluição.

Eluição

Realizou-se a eluição dos anticorpos do soro, a partir do papel-filtro, até quarenta e cinco dias após o armazenamento. Dividiu-se o papel em quatro partes iguais e cada parte foi hidratada em 187,5 µL de solução salina fosfatada (PBS; NaCl 8.5g, Na₂HPO₄·2H₂O 1.55g, NaH₂PO₄·H₂O 0.23g, H₂O q.s.p.1000 mL, pH 7.2), *overnight* a 4 °C. Testes iniciais demonstraram que poderim ser obtidos 50 µL de soro (1/3 do volume de sangue total) a partir de 3 cm² de papel. Sendo assim, cada um quarto de papel (12,5 µL de soro), ao ser reconstituído com a solução salina, resultava em uma diluição 1:16 do soro. Submeteram-se os eluídos do papel-filtro aos testes sorológicos para a pesquisa de anticorpos específicos para o NDV.

Detecção de anticorpos

Titularam-se anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle mediante a prova de inibição da hemaglutinação (HI), conforme metodologia-padrão preconizada pela OIE (2000). Soros das aves foram diluídos a partir de 1:4 até 2.048 em solução salina fosfatada PBS e incubadas com o NDV (cepa vacinal La Sota – quatro unidades hemaglutinantes) durante sessenta minutos a 20°C. A seguir, adicionou-se uma suspensão de hemácias de galinha a 1%. A leitura foi procedida quando todas as hemácias do controle estiveram sedimentadas. O título de anticorpos foi considerado como a maior diluição capaz de inibir completamente a hemaglutinação viral. Considerou-se o título de inibição da hemaglutinação maior ou igual a 1:16 considerado como uma amostra “reagente”. A validade dos resultados foi assegurada por meio de um soro controle negativo e de um soro controle positivo, com título de anticorpos conhecido. Realizou-se o teste de HI com soro eluído do papel-filtro (EPF), como descrito para as amostras de soro. Porém, a diluição inicial do eluído do papel-filtro foi considerada como equivalente à diluição 1:16 do soro.

Métodos estatísticos

Calcularam-se a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN), comparando-se o teste de HI a partir do sangue total eluído do papel-filtro (HI-EPF) com o teste de HI realizado com soro (HI-soro). Foram verificados, ainda, a precisão (exatidão), indicador que considera de maneira conjunta as predições corretas do procedimento, positivas e negativas, e o coeficiente de correlação, para avaliar o grau de correlação entre os dois testes. Calculou-se a associação entre as duas técnicas pelo teste de Fisher.

RESULTADOS

Na Tabela 1 estão representados os resultados dos dois testes evidenciando a positividade e a negatividade da resposta de um teste em rela-

ção ao outro. Embora todas as aves tenham sido imunizadas para doença de Newcastle conforme protocolos rotineiramente utilizados em plantéis aviários, das noventa e oito aves examinadas, apenas cinquenta e oito (59,2%) apresentaram-se soro-reagentes pela prova de HI. Destas, quarenta e nove (50%) apresentaram-se positivas quando se utilizaram amostras eluídas de papel-filtro (EPF) no teste. O HI-soro demonstrou resultados negativos em quarenta amostras (40,8 %) e o HI-EPF em quarenta e nove (48,9 %) (Tabela 1). A sensibilidade, a especificidade, o VPP e o VPN para o HI-EPF, comparado ao HI-soro, foram de 89%, 73%, 76% e 87%, respectivamente. Foi detectado um índice de precisão de 80 %. O coeficiente de correlação entre as duas técnicas foi 0,81 %.

TABELA 1. Comparação entre os resultados do teste de inibição da hemaglutinação (HI) para a detecção da presença de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle a partir do soro (HI-soro) e do sangue total eluído do papel-filtro (HI-EPF) em noventa e oito amostras coletadas

HI-EPF	HI-soro		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	44	5	49
Negativos	14	35	49
Total	58	40	98

Quando feita comparação entre os níveis de anticorpos, das noventa e oito amostras analisadas, cinquenta e nove amostras EPF apresentaram títulos idênticos àqueles obtidos com soro (60,2 %) e quatorze amostras (14,3 %) diferiram não mais do que uma diluição (Tabela 2). Das amostras reagentes no soro, mas que o EPF não detectou anticorpos, doze (85,7%) foram falso-negativas. Das dezessete amostras positivas para o NDV a títulos maiores que 32, somente duas (11,7%) correspondentes no EPF não foram reagentes. Das cinco amostras de EPF que apresentaram resultado falso-positivo, todas se apresentaram reagentes à diluição 1:16. A associação entre os dois métodos foi altamente significativa ($p <$

0.001) quando analisada pelo teste de Fisher. O título geométrico médio de anticorpos foi 33,6 e 33,1 para os soros e EPF, respectivamente.

TABELA 2. Comparação dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) entre noventa e oito amostras de soro e amostras de soro eluídas de papel-filtro para o vírus da doença de Newcastle

Títulos de anticorpos HI no soro	Nº de amostras	Nº de amostras (%) com	
		Títulos idênticos	Diferença em uma diluição
< 16	40	35 (87,5)	0 (0,0)
16	21	10 (47,6)	1 (0,0)
32	19	10 (52,6)	5 (26,3)
64	8	3 (37,5)	4 (50,0)
128	8	1 (12,5)	2 (25,0)
256	1	0 (0,0)	1 (100)
512	1	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	98	59 (60,2)	14 (14,3)

DISCUSSÃO

O uso de sangue impregnado em papel-filtro é de grande valor para a realização de estudos epidemiológicos em áreas de difícil acesso ou em casos de estudos com aves silvestres, em que a quantidade de sangue a ser coletado pode ser um fator limitante, embora a utilização de soro possa ser preferível em áreas com suficiente infra-estrutura. Este trabalho procurou avaliar um método simples de coleta de sangue para a detecção da presença e nível de anticorpos contra o NDV, utilizando papel-filtro Whatman como meio de transporte das amostras de sangue. O papel filtro Whatman é amplamente utilizado em laboratórios, é de fácil aquisição e não necessita de prévia esterilização. O volume aproximado de 150 µl de sangue, utilizado no presente trabalho, foi facilmente impregnado pelo papel.

Neste estudo foi utilizada solução salina fosfatada (PBS) como eluente, pelo fato de ser o tipo de solução recomendada na elaboração da técnica padrão de HI. Embora diferentes tipos de soluções possam ser aplicados para eluição do soro desidratado, a eluição do papel-filtro

neste estudo mostrou-se eficiente, uma vez que a maioria das amostras (74 %) apresentou resultados equivalentes aos soros correspondentes. Além disso, quando os níveis de anticorpos dos soros EPF foram comparados aos títulos correspondentes, não houve diferença estatisticamente significativa. O título geométrico médio de anticorpos foi 33,6 e 33,1 para os soros e EPF, respectivamente. Especificamente com relação ao uso de papel-filtro para verificação de anticorpos contra o NDV, trabalhos anteriormente relatados descrevem o uso de detergentes para a eluição (ROY et al., 1992; ROY et al., 1997). Embora o uso de substâncias adicionais possa melhorar o processo de eluição, os dados do presente estudo demonstram que isso não é necessário.

Para a avaliação do uso do sangue em papel-filtro visando detectar anticorpos, foi preestabelecida a análise de um plantel de aves imunizadas para o NDV, buscando um elevado número de amostras positivas. Entretanto, das noventa e oito amostras examinadas, apenas cinquenta e oito (59,2%) apresentaram-se reagentes pela prova de HI. Pode ser especulado que a razão para essa pouca eficácia na indução de resposta imune humoral seja decorrente da perda da potência da vacina, da administração de dose incorreta ou ainda de problemas nutricionais, da presença de agentes imunossupressores ou tóxicos, entre outros fatores.

Das cinquenta e oito amostras de soro reagentes examinadas, quarenta e nove (84,5 %) foram positivas quando se utilizaram amostras EPF. O HI-soro demonstrou resultados negativos em quarenta amostras (40,8 %), enquanto que o HI-EPF demonstrou quarenta e nove (48,9 %). Essas diferenças resultaram em índices de sensibilidade e especificidade de 89 e 73, respectivamente, quando os resultados foram estatisticamente comparados com aqueles obtidos pelo método padrão que usa amostras de soro. O VPP e o VPN para o HI-EPF, em comparação com o HI-soro, foram de 76% e 87 %, respectivamente. O índice de precisão foi de 80 % e o coeficiente de correlação entre as duas técnicas foi 0,81 %. Todas essas análises sugerem a classificação do teste de HI-EPF como sendo muito bom, o que leva a ser considerado um teste recomendável.

Quando foram comparados os níveis de anticorpos, das noventa e oito amostras analisadas, cinquenta e nove amostras EPF apresentaram títulos idênticos àqueles obtidos com soro (60,2 %) e quatorze amostras (14,3 %) diferiram não mais do que uma diluição. Teoricamente, diferença de uma diluição neste teste representa uma variação técnica aceitável. Aceitando esse conceito, considera-se que 74% das amostras EPF apresentaram os mesmos títulos das amostras de soro, durante a avaliação quantitativa. Das amostras reagentes no soro, mas que no EPF não se detectaram anticorpos, doze (85,7%) foram falso-negativas, provavelmente porque o soro correspondente foi positivo para anticorpos HI a um título baixo (16 ou 32).

Das dezessete amostras positivas para o NDV a títulos maiores que 32, somente dois (11,7%) correspondentes no EPF não foram reagentes. Das cinco amostras de EPF que apresentaram resultado falso-positivo, todas se apresentaram reagentes somente à diluição 1:16. No conjunto, tais índices indicam que existe a possibilidade de que o teste de HI resulte em resultados duvidosos ou equivocados quando forem utilizadas amostras de animais que possuem baixos títulos de anticorpos. Ou seja, os resultados obtidos neste estudo indicam que o uso do sangue em papel-filtro para detectar anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o NDV é confiável quando os títulos de anticorpos são iguais ou acima de 32. O método parece ser de valor limitado para confirmação de diagnóstico individual de infecção pelo NDV. Porém, a possibilidade de detecção de anticorpos a partir do sangue total em papel-filtro pode permitir seu uso em estudos de prevalência.

Em resumo, este estudo demonstra que é possível a utilização de sangue em papel-filtro como meio de transporte para a determinação de anticorpos inibidores da hemaglutinação contra o NDV.

REFERÊNCIAS

CHAKRAVARTIA, A.; RAWATA, D.; YADAV, S. Whole blood samples as an alternative

to serum for detection of immunity to measles virus by ELISA. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, p. 563-567, 2003.

FRIEND, M.; FRANSON, J. C. **Field manual of wildlife diseases: general field procedures and diseases of birds**. Washington D. C.: USGS, 1999.

HOGREFE, W. R.; ERNST, C.; SU, X. Efficiency of reconstitution of immunoglobulin G from blood specimens dried on filter paper and utility in herpes simplex virus type-specific serology screening. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1338-1342, 2002.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. 629 p.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. World Organization for animal health. **Manual of standard for diagnostic tests and vaccines**. 4. ed. Paris: [s.n.], 2000.

PUNNARUGSA, V.; MUNGMEE, V. Detection of rubella virus immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies in whole blood on Whatman Paper: comparison with detection in sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 10, p. 2209-2212, 1991.

ROY, P.; NACHIMUTHU, K.; VENUGOPALAN, A. T. A modified filter paper technique for serosurveillance of Newcastle disease. **Veterinary Research Communications**, v.16, p. 403-406, 1992.

ROY, P.; NACHIMUTHU, K.; KOTEESWARAN, A.; ALBERT, A.; VENUGOPALAN, A. T. Postvaccinal immune response to regimens of Newcastle disease vaccination by filter paper sampling technique. **Tropical Animal Health and Production**, v. 29, p.20-24, 1997.

THANGAVELU, A.; DHINAKAR R. A. J. G.; ELANKUMARAN, S.; KOTEESWARAN, A.

Evaluation of a filter paper blood sampling technique for quantitative assessment of antibodies to infectious bursal disease virus. **Tropical Ani-**

mal Health and Production, v. 32, p. 179-182, 2000.

Protocolado em: 28 jun. 2006. Aceito em: 1º dez. 2006.