

EMMANUELA TINÉ DE ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE UMA MICROIMUNODIFUSÃO EM GEL
DE ÁGAR PARA DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE
PEQUENOS RUMINANTES EM CAPRINOS**

**RECIFE, PE
JULHO DE 2006**

EMMANUELA TINÉ DE ARRUDA

**AVALIAÇÃO DE UMA MICROIMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR PARA
DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM
CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

**RECIFE, PE
JULHO DE 2006**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

A779a Arruda, Emmanuela Tiné de
Avaliação de uma microimunodifusão em gel de agar
para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes
em caprinos / Emmanuela Tiné de Arruda. -- 2006.
77 f. : il.

Orientador : Roberto Soares de Castro
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) --
Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departa –
mento de Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia

1. LVPR
 2. Diagnóstico
 3. IDGA
 4. Caprino
- I. Castro, Roberto Soares de
II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

AVALIAÇÃO DE UMA MICROIMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR PARA
DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM
CAPRINOS

Dissertação de Mestrado elaborada por

EMMANUELA TINÉ DE ARRUDA

Aprovada pela

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr. Roberto Soares de Castro (Orientador)

Dr.^a Ana Karina Cunha Callado
LANAGRO-PE

Professor Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva
UFRPE

Professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota
UFRPE

Recife, Julho de 2006

Dedicatória

**Dedico mais esta conquista aos
meus avós José de Sales Tiné (*In
memorian*) e Clara Severo Salomé (*In
Memorian*)**

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Á DEUS que esteve comigo durante as dificuldades encontradas em todos os momentos de minha vida. Nas etapas em que fraquejava sempre encontrei a esperança em Suas Palavras.

Obrigada, meus grandiosos pais, Tadeu de Arruda Salomé e Arivoneide Tiné de Arruda, porque sempre souberam me confortar e acarinhar quando mais pedia colo.

Obrigada minha amada avó, Maria de Lourdes Santos Tiné, aos meus irmãos, Matheus Tiné de Arruda e Danniel Tiné de Arruda e meus amigos, Andréa de Paula Lobo, Fabiani Coutinho Guido, Sildivane Valcácia, Alessandra Ribeiro Albuquerque, Graziely Aleixo, Maria Eugênia Nunes, Renato Bezerra Alves, Marcelo Bezerra que também me apoiaram nesta longa etapa.

Obrigada, meu amor, namorado, companheiro, amigo, Paulo Gustavo C. L. Almeida, por sempre acreditar em mim e sempre me incentivar dando força para concluir este trabalho.

Obrigada meu orientador, Prof. Dr. Roberto Soares de Castro, que sempre me apoiou e me mostrou, num momento especial de minha vida, a sua sensatez e paciência nas dificuldades que enfrentava.

Aos meus queridos amigos do Laboratório, Michele Moreira de Oliveira, Ana Cláudia Campos, Sérgio Nascimento, Miguel Fumagalli, Sheila Gomes, que como uma verdadeira equipe me ajudou na execução do projeto. Um agradecimento especial à Michele Moreira de Oliveira e Sheila Gomes que em todas as fases deste trabalho permaneceram presentes.

Agradeço aos meus amigos Sílvia Romero de Abreu, Lúcia Sadae e Ana Karina C. Callado pela ajuda e apoio na realização desta etapa.

Agradeço e ofereço esta vitória a todos vocês, meus verdadeiros AMIGOS!

Sumário

SUMÁRIO

	Pág.
DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vii
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO	xx
INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1. Lentivirose de Pequenos Ruminantes.....	27
2.2. Diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	40
2.2.1 Imunodifusão em gel de agar (IDGA).....	41
2.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	43
CAPÍTULO 1	
AVALIAÇÃO DE UMA MICROIMUNODIFUSÃO PARA DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR) EM CAPRINOS	48
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	52
Micro IDGA.....	52
Produção de antígeno (Ag).....	52
Produção de soro padrão (SP).....	52
Realização dos Testes.....	53
Comparação da micro e macro-IDGA.....	54
Resultados e Discussão.....	56
Conclusões.....	61
Referências Bibliográficas.....	61
3 CONCLUSÕES FINAIS	63
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Etiologia e principais manifestações da infecção por Lentivírus (PÉPIN et al.,1998).....	30
Tabela 1.1 - Resultado dos testes de macroimunodifusão (Macro-IDGA) e microimunodifusão (Micro-IDGA) para Lentivírus de Pequenos Ruminantes.....	58

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Estrutura dos provírus dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (CAEV e Maedi-Visna) e HIV-1 (Adaptado de CLEMENTES e PAYNE, 1994).....	29
Figura 2 - Esquema da partícula dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (adaptado de COFFIN, 1996).....	31
Figura 1.1 - Esquema de molde utilizado. Nos poços 1, 3 e 5: 10µl de soro padrão; 2, 4 e 6: 30µl dos soros a serem testados e no poço 7: 10µl de antígeno.....	54

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

- Ag - Antígeno
- BIV - Vírus da Imunodeficiência Bovina; *Bovine immunodeficiency virus*
- CA - Proteína do Capsídeo Viral
- CAEV - Vírus da Artrite-encefalite Caprina; *Caprine arthritis-encephalitis virus*
- CAEV-Co - Amostra Viral Padrão (CAEV Cork)
- DNA proviral - Partícula resultante da transcrição do RNA viral
- ECP - Efeito Citopático
- EIAV – Vírus da Anemia Infecciosa Equina; *Equine infectious anaemia virus* (VAIE)
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático
- *env* - Gene codante para proteínas estruturais
- FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina; *Feline immunodeficiency virus*
- *gag* – Gene codante para proteínas estruturais
- *Gold Standard test* - Teste Padrão Ouro
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Adquirida; *Human immunodeficiency virus*
- IFI - Imunofluorescência Indireta
- IN - Enzima Integrase
- *K* - *Kappa*
- LTR - *long terminal repeat*; Regiões Terminais não codantes
- LVPR - Lentivírus de Pequenos Ruminantes
- MA - Proteína da Matriz
- macro-IDGA - Macroimunodifusão em gel de ágar; agar gel macroimmunodifusion test - macro- AGID

- micro-IDGA - Microimunodifusão em gel de ágar ; agar gel microimmunodifusion test - micro- AGID
- MEM - Meio Essencial Mínimo
- MSC - Membrana Sinovial Caprina
- MVV - Vírus Maedi-Visna; *Maedi-visna virus*
- NaOH - Hidróxido de Sódio
- NP - Nucleoproteína
- OIE - Organização Mundial de Saúde Animal
- OPPV - Pneumonia Progressiva Ovina
- ORF- *open reading frames*; Áreas adicionais do DNA proviral
- PBS - *Phosphate Buffet Saline*
- PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
- PEG - Polietilenoglicol
- pH - Potencial de Hidrogênio Iônico
- PI - Pós-Inoculação
- PNSCO - Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina
- *pol* - Gene codante para enzimas virais
- PR - Enzima Protease
- *rev* - Gene codante para proteínas reguladoras da expressão viral (Rev)
- RIA - Radioimunoensaio
- RIPA - Radioimunoprecipitação
- RT - Enzima Transcriptase Reversa
- RNA – Ácido Ribonucleico

- SC - Soro Caprino
- SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
- SIV - Vírus da Imunodeficiência Simian; *Simian immunodeficiency virus*
- SP - Soro Padrão
- SRD - Sem Raça Definida
- SU - Glicoproteínas de Superfície
- TM - Proteína Transmembranar
- UP - Unidades Precipitantes
- *unique 3* (U3) - Curtas seqüências *repeat* (R) idênticas e com mesma orientação da *unique 5* localizada na extremidade 3' do DNA-proviral
- *unique 5* (U5) - Curtas seqüências *repeat* (R) idênticas e com mesma orientação da *unique 3* localizada na extremidade 5' do DNA-proviral
- *tat* - Gene codante para proteínas reguladoras da expressão viral (Tat)
- TIGEF - Células fibroblásticas de embrião caprino imortalizadas - T
- *vif* - Gene codantes para proteínas reguladoras da expressão viral (Vif)
- WB - Western Blotting
- WV - Vírus inteiro - Whole Vírus

Resumo

As Lentivirose de Pequenos Ruminantes (Artrite-encefalite Caprina - CAE e Maedi-Visna) são caracterizadas por curso lento e progressivo, onde a maioria dos animais acometidos não apresenta sintomatologia clínica, sendo a sorologia a forma mais prática de diagnóstico, pois a presença de anticorpos demonstra indiretamente a existência da infecção por Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR). Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar uma microimunodifusão em gel de ágar (micro-IDGA) comparativamente a uma macroimunodifusão em gel de ágar (macro-IDGA) para ser utilizada no diagnóstico sorológico de LVPR em caprinos, com base na sensibilidade e na especificidade relativas, bem como no índice de concordância ajustada *Kappa* (*K*). Os cálculos foram feitos de acordo com os resultados do teste de 262 amostras de soros caprinos, colhidos em animais leiteiros de quatro propriedades, localizadas nos Estados do Rio Grande do Norte (1), Pernambuco (2) e Paraíba (1). Os resultados obtidos revelaram sensibilidade e especificidade relativas de 100% e uma perfeita concordância entre os testes (*Kappa* = 1,00). Ao avaliar as características qualitativas, como a intensidade da linha de precipitação, nitidez e o tempo para determinação de resultados, observou-se que a micro-IDGA apresentou reações mais nítidas que a macro-IDGA, na leitura dos controles positivos feita após 24 horas de incubação. Entretanto, não houve diferença na leitura realizada após 48 horas. Pelo exposto conclui-se que a micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA no diagnóstico sorológico de LVPR e que o tempo de leitura e definição dos resultados pode ser reduzido para 48 horas, sem comprometimento da confiabilidade dos resultados.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, estando presente em áreas sob as mais diversas características climáticas e botânicas. No entanto, somente em alguns países essa atividade apresenta expressão econômica, sendo, na maioria dos casos, desenvolvida de forma empírica e extensiva, apresentando baixa produtividade e reduzida rentabilidade (LEITE, 2006; NOGUEIRA FILHO e ALVES, 2002).

No Brasil, o rebanho caprino representa 2,1% do efetivo mundial. Apesar de apresentarmos as condições apropriadas para este tipo de exploração nossos rebanhos são numericamente inexpressivos. Na região Nordeste, concentram-se os maiores rebanhos com 9,3 milhões de cabeças. Na criação de caprinos destacam-se os Estados da Bahia (3,9 milhões de cabeças), Pernambuco (1,5 milhão) e Piauí (1,4 milhão) (IBGE, 2004).

Nesta região a criação de caprinos tem fundamental importância sócio-econômica, pois representa uma alternativa na oferta de carne, leite e seus derivados, especialmente para população rural. A venda de peles no mercado nacional e internacional aumenta a renda do criador contribuindo para a fixação do homem no campo, como também o aumento de divisas para os Estados e para o País (LEITE, 2006).

A análise da cadeia produtiva da caprinovinocultura tem demonstrado um grande potencial de expansão da atividade, que necessita de ações que permitam a maior disponibilidade de produtos de qualidade superior, com valor agregado. Desta forma, à medida que se aumenta o incentivo para ampliação deste agronegócio, através do melhoramento genético de caprinos SRD e ovinos crioulos, aumenta-se o risco de transmissão de enfermidades, sobretudo as lentiviroses de pequenos ruminantes para esses

animais, sendo fundamental, neste caso, o controle sanitário dos animais envolvidos nos programas de melhoramento (CASTRO e MELO, 2001).

A importância econômica da infecção por Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) está fortemente relacionada ao tipo de exploração animal. Tem-se observado perdas diretas (perda de peso, diminuição na produção leiteira, redução na duração do período de lactação, retardos no crescimento de crias, aumento dos distúrbios reprodutivos, entre outras) significativas em caprinos e ovinos de alta produtividade, bem como perdas indiretas (desvalorização dos rebanhos, reposição precoce de animais que desenvolvem os sintomas, despesas com medidas de controle, pesquisa e desenvolvimento, barreiras comerciais para produtos de multiplicação animal, dentre outras) (CASTRO e MELO, 2001). Em animais de baixa produtividade, criados em sistema tradicional de manejo, as perdas causadas por LVPR podem ser mascaradas por outros problemas, originários de práticas inadequadas de manejo ou de outras enfermidades.

A infecção por LVPR é caracterizada, muitas vezes, por animais soropositivos aparentemente saudáveis. Assim, a sorologia é o meio mais freqüente utilizado para o diagnóstico indireto da infecção. Existe uma variedade de técnicas laboratoriais para diagnóstico de LVPR, que incluem a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), radioimunoprecipitação (RIPA), radioimunoensaio (RIA), e *Western Blotting* (de ANDRÉS et al., 2005).

A IDGA é o teste sorológico mais usado, apresenta boa aceitação pelo baixo custo, boa sensibilidade e especificidade, além da praticidade de execução e leitura (ABREU et al., 1998), porém apresenta baixa sensibilidade quando comparada ao ELISA. O ELISA, mesmo apresentando uma sensibilidade superior a IDGA, apresenta entraves para uso

rotineiro, pois os custos para sua realização são altos, necessitando de um laboratório equipado e experiência do executor.

No Brasil, o teste que tem sido empregado e que está previsto pelo Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) é a IDGA. Foram desenvolvidos protocolos de IDGA com antígeno CAEV usando-se 20 μ l ou 30 μ l (GOUVEIA et al., 2000) dos reagentes, aqui denominadas de macro-IDGA. Apesar de preconizado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2006) não há registros da avaliação de uma micro-IDGA para diagnóstico de LVPR em caprinos, que foi originalmente testada para ovinos (WINWARD et al., 1979).

Pelo exposto o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar uma micro-IDGA para ser utilizada no diagnóstico sorológico da infecção pelo lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lentivirose de Pequenos Ruminantes

Os pequenos ruminantes podem ser infectados por um grupo de vírus genericamente denominado de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) (CASTRO et al., 1999), que compreende vários isolados, distribuídos em quatro grupos filogenéticos, que compartilham similaridade genética, mecanismo molecular de replicação, morfologia e interação biológica com os hospedeiros (SHAH, 2004). Os protótipos dos dois grupos principais são os vírus Maedi-Visna (MVV), também denominado Pneumonia Progressiva Ovina (OPPV) e o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), originalmente isolados de ovinos e caprinos, respectivamente. CAEV e MVV compartilham similaridades estruturais entre si e com outros lentivírus como o HIV (Figura 1) e também similaridades biológicas, algumas também comuns ao HIV, SIV, FIV, BIV (PÉPIN et al., 1998) (Tabela 1).

As partículas dos lentivírus são esféricas, com diâmetro de 80-100 nm. Possuem um envelope fosfolipídico externo que contém as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranar (TM). As principais proteínas internas são a da matriz (MA), do capsídeo (CA) e a nucleoproteína (NP) que está associada ao RNA genômico. Existem ainda, as proteínas com propriedades enzimáticas, como a transcriptase reversa (RT), a protease (PR) e a integrase (IN) (Figura 2) (CLEMENTS e PAYNE, 1994; MURPHY et al., 1995).

O seu genoma é formado por duas moléculas idênticas de RNA, de aproximadamente 10 000 pares de bases, que contém nas extremidades 3' e 5' duas curtas seqüências *repeat* (R) idênticas com mesma orientação, e uma seqüência em cada extremidade, denominada *unique 5* (U5) e *unique 3* (U3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral. Depois da retrotranscrição, o DNA proviral resultante, apresenta duas regiões terminais não codantes (*long terminal repeat* – LTR).

Entre essas regiões extremas estão localizados os genes codantes para proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), além de pequenas áreas adicionais, chamadas *open reading frames* (ORF), codantes para proteínas reguladoras da expressão viral (*tat*, *rev* e *vif*) (Figura 2) (CLEMENTS e PAYNE, 1994).

O gene *gag* codifica o precursor, que resulta nas proteínas MA (p17), CA (p25 e p28), NP (p14); o *pol* codifica as proteínas de atividade enzimática (RT, PR, IN, dUTPase); o *env* codifica o precursor das glicoproteínas do envelope (SU – gp135, e TM – gp44); *tat*, *rev* e *vif* codificam as proteínas reguladoras da expressão viral Tat, Rev e Vif, respectivamente (GOURDOU et al., 1989; SALTARELLI et al., 1994; SCHOBORG et al., 1994; HARMACHE et al., 1995; GAZIT et al., 1996).

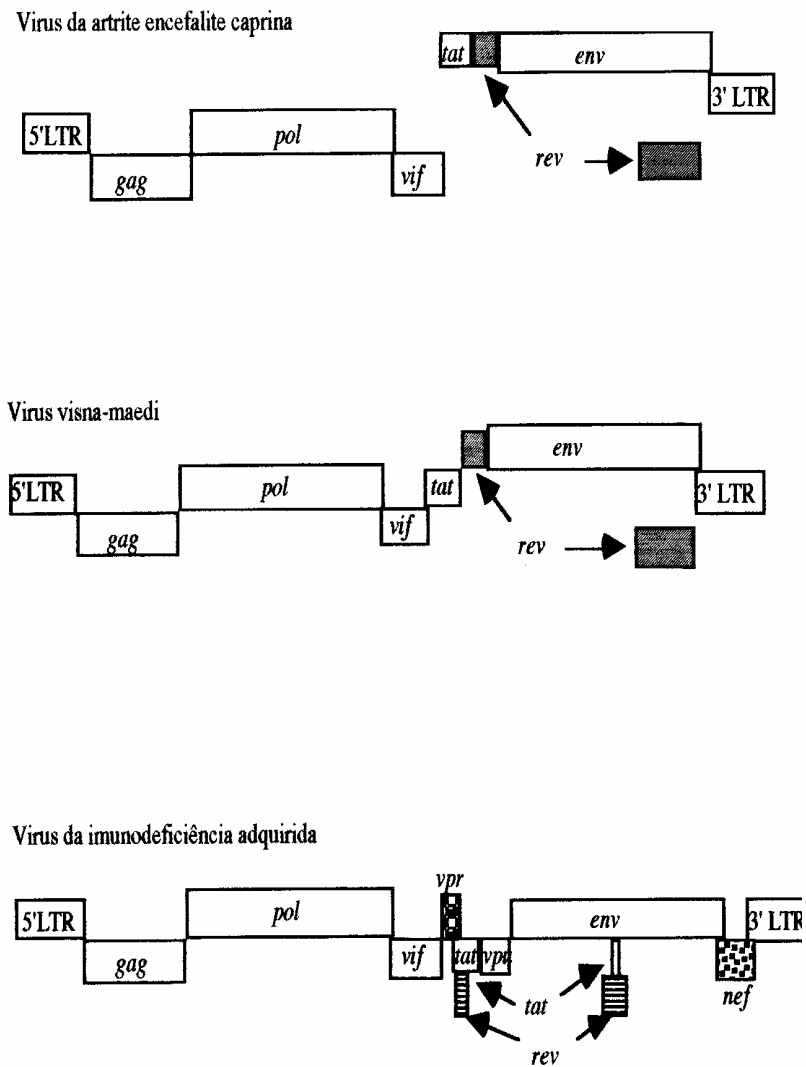


Figura 1 – Estrutura dos provírus dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (CAEV e Maedi-Visna) e HIV-1 (Adaptado de CLEMENTES e PAYNE, 1994).

Tabela 1 - Etiologia e principais manifestações da infecção por Lentivírus (PÉPIN et al.,1998)

Vírus	Hospedeiro natural	Células alvo	Manifestações clínicas
MVV	Ovino	Monócito/macrófago	Pneumonia Encefalite Mastite Artrite
CAEV	Caprino	Monócito/macrófago	Pneumonia Encefalite Mastite Artrite
EIAV	Eqüino	Monócito/macrófago	Febre Anemia Portadores assintomáticos
HIV	Homem	Linfócito CD4 ⁺ Monócito/macrófago	Imunodeficiência Mielopatia Infecções oportunistas (AIDS)
FIV	Felino	Linfócito T, CD4 ⁺ e CD8 ⁺ Linfócito B Monócito/macrófago	Imunodeficiência Infecções oportunistas (AIDS)
SIV	Macaco	Linfócito Monócito/macrófago	Imunodeficiência Infecções oportunistas
BIV	Bovino	Linfócito T Linfócito B Monócito/macrófago Célula T $\gamma\delta$	Infecção subclínica Imunodeficiência?

MVV – *Maedi-visna virus*; CAEV – *Caprine arthritis-encephalitis virus*; EIAV – *Equine infectious anaemia virus*; HIV – *Human immunodeficiency virus*; FIV – *Feline immunodeficiency virus*; SIV – *Simian immunodeficiency virus*; BIV – *Bovine immunodeficiency virus*

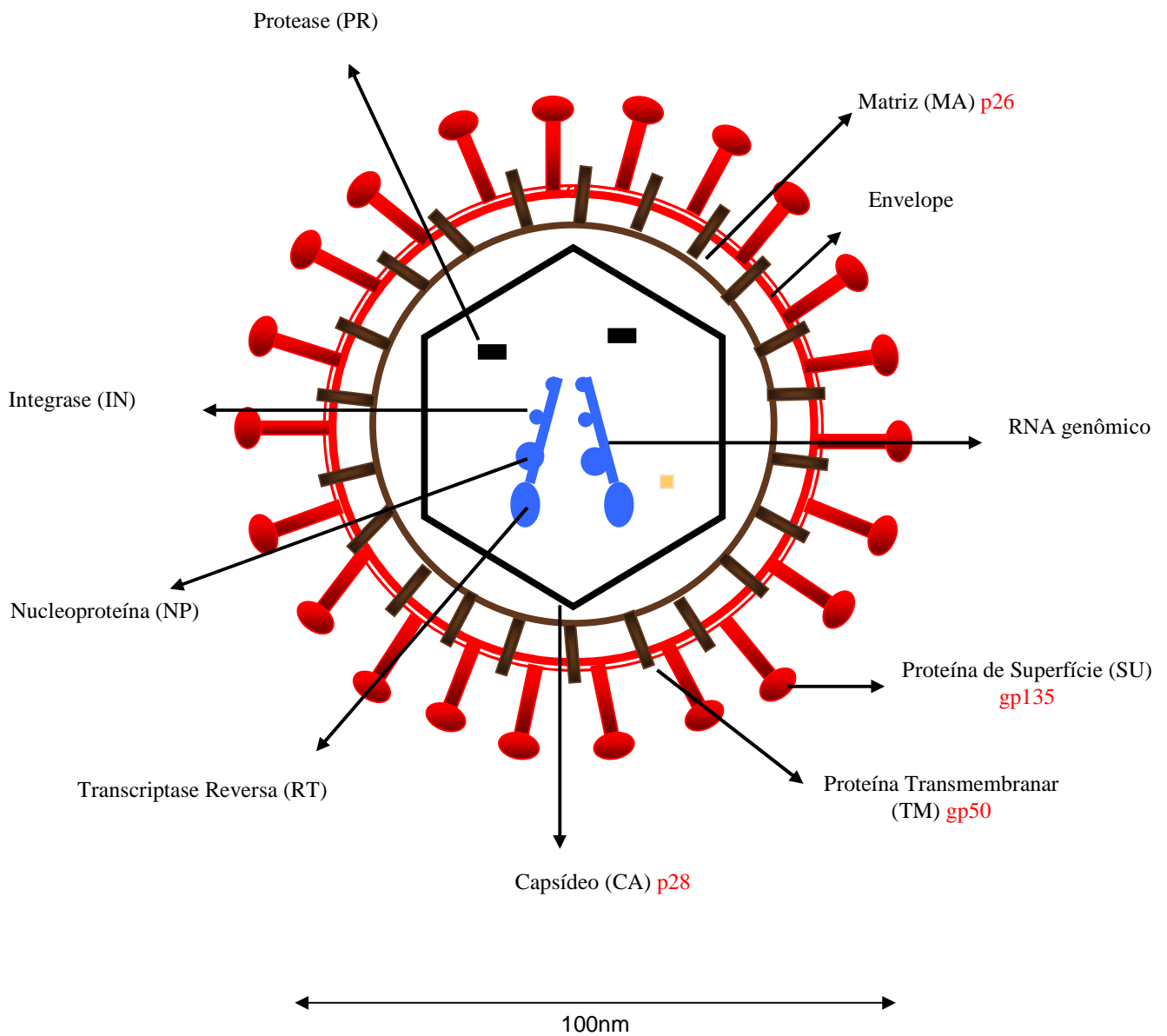


Figura 2 – Esquema da partícula dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (adaptado de COFFIN, 1996).

Quando *in vitro*, os LVPR podem-se replicar em vários tipos celulares, como as células fibroblásticas do plexo coróide (CHEBLOUNE et al., 1996; FEVEREIRO et al., 1999; SKRABAN et al., 1999; CELER Jr. et al., 1998; CELER Jr. et al., 2000), membrana sinovial (NARAYAN et al., 1980; KLEVJER-ANDERSON e CHEEVERS, 1981; QUÉRAT et al., 1984; BLONDIN et al., 1989; DAVIES et al., 1997; ABREU et al., 1998; MSELLI-LAKHAL et al., 1998; HAZIZA et al., 2001), células musculares lisas (LEUROX et al., 1995), macrófagos alveolares (LÚJAN et al., 1994; ZHANG et al., 2000; RAVAZOLO et al., 2006), fibroblastos caprinos imortalizados (TEIXEIRA et al., 1997; MSELLI-LAKHAL et al., 1998; MSELLI-LAKHAL et al., 2000), células epiteliais do leite (LERONDELLE et al., 1999; MSELLI-LAKHAL et al., 1999; RAVAZOLO et al., 2006), células epiteliais mamárias (LERONDELLE et al., 1999), células da granulosa (LAMARA et al., 2001), e células endoteliais ovinas (LE JAN et al., 2000) e células mononucleares do sangue periférico (RAVAZOLO et al., 2006).

Durante a infecção *in vitro* o vírus causa efeito citopático (ECP) caracterizado por vacuolização e formação de sincício, seguido por morte celular. A formação do sincício parece ser resultado da interação entre as glicoproteínas do envelope viral e a membrana celular (BLONDIN et al., 1989; ABREU, 1996).

Abreu et al. (1998) citam que o cultivo celular primário que apresenta melhor permissividade à amostra viral CAEV, é o de membrana sinovial caprina (MSC), tendo o CAEV apresentado replicação satisfatória, tanto em células de baixa passagem (5^a a 7^a) como de alta (17^a a 18^a), produzindo ECP típico. Dentre as células de linhagem, as células fibroblásticas de embrião caprino imortalizadas-T (TIGEF), apresentam boa permissividade a ambos LVPR, suportando um ciclo completo de replicação viral, sobretudo entre a 60^a e 120^a passagem (TEIXEIRA et al., 1997).

Esses LVPR apresentam algumas características interessantes como a persistência da infecção no organismo mesmo frente a uma resposta imunológica, devido à restrição da replicação viral (GENDELMAN et al., 1986), e a sua capacidade de variação genética, pela elevada frequência de mutações, o que resulta na formação de subpopulações virais heterogêneas denominadas *quasispécie* (PASICK, 1998).

Os LVPR *in vivo* se disseminam lentamente, com uma produção de anticorpos mínima, alcançando títulos muito baixos, tendo como célula alvo as da linhagem monócito-fagocitárias (GENDELMAN et al., 1986; NARAYAN et al., 1982; NARAYAN et al., 1983), especialmente os macrófagos (CORDIER et al., 1990; LÚJAN et al., 1994; BRODIE et al., 1995). Em condições experimentais, a primeira resposta imune é detectada em torno da terceira semana após a infecção, sendo principalmente dirigida contra a proteína do capsídeo (CA); por volta da quinta semana são produzidos anticorpos contra as demais proteínas: nucleoproteína (NP), da matriz (MA), transmembranar (TM) e de superfície (SU) (de la CONCHA-BERMEJILLO et al., 1995). Entretanto, podem decorrer anos até a soroconversão de animais naturalmente infectados (RIMSTAD et al., 1993).

A maioria dos caprinos e ovinos infectados com LVPR não desenvolve sintomas clínicos, sendo a infecção caracterizada por alta prevalência de animais soropositivos, aparentemente saudáveis. Nos caprinos as principais manifestações clínicas incluem artrite e mastite, já nos ovinos a pneumonia intersticial e encefalite são mais frequentes. Em ambas as espécies podem ainda ser observadas linfadenopatias e emagrecimento progressivo (RUSSO et al., 1991; PHELPS e SMITH, 1993).

A forma pulmonar é mais importante para os ovinos. Os sintomas são tosse, dispnéia, taquipnéia e à ausculta ouve-se um som úmido. À necropsia podem ser observadas áreas de linfoproliferação nos pulmões e linfonodos (CUTILIP et al., 1979;

OLIVER et al., 1981; ELLIS e DeMARTIN, 1985). A pneumonia intersticial inicial evolui para pneumonia broncointersticial (PEREIRA, 1995), sendo a intensidade da pneumonia correlacionada com a carga viral (BRODIE et al., 1992).

A encefalite é observada, geralmente, em caprinos e ovinos jovens, com idade variando de dois a quatro meses, sendo caracterizada por ataxia que pode progredir à paresia ou paralisia, tremores, opistótono, torcicolo com movimentos de pedalagem (CORK et al., 1974). As lesões necroscópicas observadas são meningo-encefalomielite, desmielinização (CORK e NARAYAN, 1980) e presença de infiltrado mononuclear perivascular (CONSTABLE et al., 1996).

A artrite acomete, na maioria das vezes, animais adultos, de um a dois anos de idade, e é caracterizada pelo aparecimento de higromas e de claudicação de graus variados, principalmente na articulação cárpica. Microscopicamente, essas lesões são caracterizadas por hipertrofia das vilosidades das membranas, seguindo-se de alterações degenerativas com necrose e perda de vascularização, com infiltração de células mononucleares (ADAMS et al., 1980; PEREIRA, 1995).

A mastite nos caprinos é caracterizada macroscopicamente pelo endurecimento do úbere e agalaxia, provocando uma redução média na produção leiteira de 88kg de leite/lactação, embora a qualidade do leite não seja alterada (SMITH e CUTLIP, 1988; GREENWOOD, 1995). Microscopicamente, as lesões consistem em hiperplasia linfóide folicular ao redor dos ductos lactíferos, infiltração intersticial de células mononucleares e fibrose (LERONDELLE et al., 1989).

A infecção por LVPR em fêmeas caprinas pode acarretar outros prejuízos econômicos como, a diminuição em até 0,3kg de peso da cria ao nascer e de 6kg no peso

das crias até 120 dias, além do aumento em 25% nos distúrbios reprodutivos de cabras multíparas (GREENWOOD, 1995).

Nenhuma das formas clínicas da CAE é curável, o tratamento sintomático dos animais infectados contribui apenas para uma melhora temporária, pois não existem ainda medicamentos e/ou vacinas eficaz para o combate da doença. A utilização de antibióticos para prevenção ou combate de processos inflamatórios não é recomendado, tanto por razões econômicas quanto pelo fato de causar resistências das cepas bacterianas (FRANKE, 1998).

Estudos têm relatado diversas formas de transmissão dos LVPR tanto entre as matrizes e suas crias, como também, entre animais adultos. A importação de animais infectados com LVPR foi o primeiro passo para esta enfermidade disseminar entre diversos países. A disseminação desta virose nos rebanhos se deve, principalmente, pelo contato direto dos animais sadios, com os animais doentes (aparentemente sadios), já que os mesmos são reservatórios e a fonte de infecção de LVPR e transmite o agente por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema fagócito-mononuclear (ADAMS et al., 1983; PÉRETZ et al, 1993).

A transmissão venérea potencialmente também pode ocorrer (de la CONCHA-BERMEJILLO et al., 1996), visto que o DNA pró-viral de lentivírus caprino e partículas virais livres infecciosas foram detectados no sêmen de machos naturalmente infectados com CAEV (TRAVASSOS et al., 1998; ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al.,1999).

A transmissão do vírus através objetos contaminados com secreções e/ou excreções virais, como, por exemplo, máquina de ordenha contaminada com leite infectado, agulha, tatuadores contendo sangue contaminado, também são fontes potenciais de transmissão (ADAMS, 1986; DeMAAR et al., 1995; FRANKE, 1998).

A infecção intra-uterina tem sido questionada, Lamara et al. (2001, 2002b) demonstraram, *in vitro*, que as células epiteliais do oviduto podem ser infectadas com o vírus CAEV, mas não há estudos que confirmem este resultado *in vivo*. Fieni et al. (2002, 2003) através da PCR, utilizando amostra tecidual do oviduto de 25 cabras infectadas com LVPR, detectaram 11 animais positivos, sugerindo então que os conceptos podem ser expostos ao vírus *in vivo*.

Alguns estudos estão questionando a transmissão dos LVPR através da infecção direta de embrião e fetos. Fetos foram infectados com MVV através da inoculação do vírus por via intracerebral (GEORGSSON et al., 1978; NARAYAN et al., 1974), ou dentro do saco amniótico (CUTLIP et al., 1982). Lamara et al. (2002a) demonstrou, *in vitro*, que o embrião caprino, no estágio de 8 a 16 células, pode ser infectado pelo LVPR caso sua zona pelúcida não estivesse intacta. Nas infecções experimentais de fêmeas com menos de 60 dias de gestação ocorreu reabsorção fetal ou aborto (CUTLIP et al., 1981), mas, nos casos em que os fetos sobreviveram, os mesmos se tornaram vírus resistente. A infecção transplacentária pode ocorrer, porém a contribuição relativa desta rota de transmissão para a infecção é incerta (BLACKLAWS et al., 2004).

Estudos demonstram que o vírus pode ser encontrado nos tecidos mamários, nas células epiteliais mamárias (*in vivo*), nas células epiteliais de leite e colostro e nos macrófagos (BLACKLAWS et al., 2004). A transmissão vertical, que é favorecida pela permeabilidade intestinal dos animais recém-nascidos (HOUWERS, 1997) é devido à ingestão do colostro e leite contaminados (ADAMS et al., 1983; WATT et al., 1994; de la CONCHA-BERMEJILLO, 1997).

A infecção cruzada entre ovinos e caprinos com MVV e CAEV respectivamente, podem ocorrer experimentalmente (BANKS et al., 1983; OLIVER et al, 1985). Em adição,

comparação de seqüências de isolados naturais de LVPR de ovinos e caprinos tem sugerido que a infecção cruzada horizontal possa ocorrer naturalmente (ROLLAND et al., 2002). Portanto, para controle da infecção de LVPR os animais positivos não devem entrar em contato com caprinos e ovinos.

Castro et al. (1999) realizaram a caracterização biológica e molecular de amostras de LVPR de caprinos dos Estados de Minas Gerais (amostras BrMg1-01, BrMg1-02, BrMg2-01, BrMg2-02 e BrMg2-03) e Pernambuco (BrPe1-01), que revelou a existência de dois fenótipos em cultivo celular e dois grupos filogenéticos principais (CAEV e MVV), demonstrando conclusivamente, que ambos LVPR ocorrem em nossos rebanhos.

O vírus da CAE foi isolado pela primeira vez em 1979 nos Estados Unidos da América (EUA) da membrana sinovial e do líquido cefalorraquidiano de caprinos infectados (CRAWFORD et al., 1980). No Brasil, o primeiro relato de detecção de caprinos infectados com LVPR foi no Estado do Rio Grande do Sul (MOOJEN et al., 1986), sendo depois confirmada pelo isolamento viral por Ravazzolo et al. (1988). Posteriormente, foram relatados nos Estados da Bahia, com 12,0% de positivos (ASSIS e GOUVEIA, 1994); Ceará, com positividade de 27,5% (ASSIS e GOUVEIA, 1994) e 40,7% (MELLO e FRANKE, 1997); Rio de Janeiro, com 21,0% (CUNHA e NASCIMENTO, 1995) e São Paulo, com 48,8% (GARCIA et al., 1992). Há registro da ocorrência também no Maranhão (ALVES e PINHEIRO, 1997), Minas Gerais (ASSIS e GOUVEIA, 1994) e Paraná (SOTOMAIOR e MILCZEWSKI, 1997), Paraíba (CASTRO et al., 2002), Pernambuco (SARAIVA NETO et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006) e Rio Grande Norte (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2003).

O primeiro relato de frequência de LVPR em ovinos da raça Santa Inês foi feito por Campos et al. (2003) onde testaram 413 amostras de soros do Estado de Pernambuco,

através da IDGA, obtendo apenas três amostras soropositivas (3/413), frequência de 0,73%, embora seja quantitativamente baixa, esta frequência de animais positivos, deve ser considerada significativa, por não haver antes nenhum registro de animais positivos de raças especializadas em melhoramento genético dos ovinos SRD, o que mostrou que a raça ovina Santa Inês está sendo acometida pelos LVPR.

Almeida et al. (2001) analisando a soroprevalência de 1605 caprinos do Estado da Bahia, testados na IDGA, observaram que 215 (13,4%) animais foram positivos. Entre as amostras positivas a maior frequência foi de fêmeas 194 (90,23%) e entre as raças Alpina, Saanen e Anglo-Nubiana a positividade foram de 80 (16,06%), 77 (18,92%) e 49 (15,76%), respectivamente.

A maioria desses autores concorda que o surgimento de CAEV se deu devido a importações de raças exóticas como a Anglo Nubiana, Saanen, Parda Alpina, Toggenburg e seus cruzamentos em vários Estados (MOOJEN et al., 1986; GARCIA et al., 1992). Em Pernambuco, um inquérito epidemiológico revelou que 17,6% (70/397) dos caprinos testados, de 40 criações localizadas em 20 municípios, apresentaram reação positiva a IDGA e que cerca da metade (19/40) das criações estudadas apresentou pelo menos um animal positivo (SARAIVA NETO et al., 1995). Oliveira et al. (2006) em seu estudo feito em Pernambuco não observou diferença estatisticamente significativa entre as variáveis, sexo e faixa etária quanto à positividade para LVPR de caprinos e ovinos. Também não houve diferença entre os resultados obtidos nos abatedouros localizados nos municípios de São Lourenço da Mata e Paulista. A prevalência de animais portadores de anticorpos precipitantes contra LVPR foi de 3,72% e 5,23% para caprinos e ovinos, respectivamente.

A infecção por LVPR acomete animais de várias raças, idades e ambos os sexos. Não se pode concluir pela maior susceptibilidade racial, ou de acordo com o sexo, devido

aos estudos serem de difícil interpretação, associados aos fatores ligados ao manejo e origens diferentes das raças. Entretanto, não restam dúvidas que o tempo de exposição para soroconversão é um fator muito importante, tornando mais freqüente a presença de adultos soropositivos (CASTRO, 1998).

Torna-se, portanto, primordial o controle da disseminação desta enfermidade e o que se faz necessário basicamente é evitar métodos de transmissão do vírus, isto tem ocorrido através de medidas preventivas, tais como: a separação das crias logo após o nascimento, evitar que as crias entrem em contato com secreções dos adultos isolando-os, administrar colostro termicamente tratado (de cabras não infectadas ou de vacas), oferecer substituto do leite as crias, testar os animais em intervalos regulares separando ou eliminando do rebanho os animais soropositivos, adotar a linha de ordenha, controlar a monta com reprodutores positivos, usar material estéril (seringa, tatuadores, agulhas, instrumentos cirúrgicos, etc) (ADAMS et al., 1983; CALLADO et al., 2001). Este controle deve ser bem criterioso devido à ocorrência de portadores assintomáticos, lenta produção de anticorpos, indisponibilidade de vacinas. A comercialização de animais é também um fator agravante, uma vez que com a introdução de animais infectados no plantel a disseminação da enfermidade é praticamente inevitável (FROTA et al., 2005).

Portanto, o sucesso em controlar a difusão da infecção do LVPR, também, está em diagnosticar os animais precocemente e remover os animais soropositivos (ROWE e EAST, 1997).

2.2 Diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

A forma mais prática de diagnosticar os LVPR é através da sorologia, a presença de anticorpos demonstra indiretamente a existência de infecção. Existe uma variedade de técnicas laboratoriais para diagnóstico de LVPR, estas incluem a imunodifusão em gel de agar (IDGA), os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), radioimunoprecipitação (RIPA), radioimunoensaio (RIA), e *Western Blotting* (WB) (de ANDRÉS et al., 2005).

A sensibilidade relativa do teste de IDGA contra o ELISA têm sido determinada em vários estudos. O teste de ELISA detecta anticorpos numa maior proporção de soro que o teste de IDGA. Avaliando amostras seriadas de infecções experimentais, este teste detecta soroconversão mais precocemente que a IDGA (VITU et al., 1982; SIMARD e BRISCOE, 1990; SAMAN et al., 1999). A sensibilidade e a especificidade do teste de IDGA (CAEV) em comparação a RIPA foi de 91% e 100%, respectivamente, usando 218 amostras de soro caprino (KNOWLES et al., 1994). Varea et al. (2001) examinaram 1941 soros de 693 carneiros sequencialmente em um período de 3-4 anos e encontrou uma sensibilidade e especificidade de 76.3% e 98.3%, respectivamente, comparando aos resultados concordantes dos soros no ELISA e WB. O teste de IDGA parece ter uma baixa sensibilidade quando comparada a RIPA, ELISA, e WB (de ANDRÉS et al., 2005).

Embora a técnica de ELISA seja geralmente mais sensível que o teste de IDGA, a IDGA está no Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) por existir uma estrutura a nível Nacional em condições de utilizá-lo, devido ao menor custo com equipamentos, fácil execução, possibilidade de testar caprinos e ovinos no mesmo momento sem alteração dos reagentes. Para os ELISAs são necessários sais de elevado grau de pureza, equipamento para leitura dos resultados, além de reagentes específicos para

cada espécie animal tornando então, um procedimento de custo mais elevado dificultando assim a sua utilização.

Os testes: RIPA, RIA e WB (GOGOLEWSKI et al., 1985; ARCHAMBAULT et al., 1988; TORFASON et al., 1992) não são usados como testes de triagem porque são testes que levam tempo longo para sua execução. Por outro lado, são usados frequentemente como *Gold Standard* para o diagnóstico de LVPR. Muitos estudos descrevem a utilização da reação em cadeia de polimerase (PCR) como um método para detecção de LVPR no sangue e em outros tecidos, embora tenha sido feita pouca estimativa da sensibilidade e especificidade (de ANDRÉS et al., 2005).

2.2.1 Imunodifusão em gel de agar (IDGA)

A IDGA é o teste sorológico mais usado, apresenta boa aceitação pelo baixo custo, sensibilidade e uma boa especificidade, além da praticidade de execução e leitura (ABREU et al., 1998), sendo juntamente com o ELISA o teste recomendado pela OIE para diagnóstico de LVPR (OIE, 2006). A IDGA utiliza como antígeno o vírus completo que foi concentrado de sobrenadantes de cultura celular e rompido pela adição de detergentes ou por outros tipos de tratamentos. Os anticorpos detectam como antígeno as proteínas nucleares de MVV (p25) ou CAEV (p28) e a glicoproteína de superfície gp135.

D'Angelino et al. (1993) ao estudarem uma fração do rebanho caprino de São Paulo realizaram a IDGA em 837 animais, tendo como resultado: 314 animais soropositivos (37,5%), 482 animais soronegativos (57,6%) e 41 animais inconclusivos (4,9%). Castro et al. (1994) utilizando o mesmo teste puderam evidenciar a presença de anticorpos contra o CAEV no Estado de Pernambuco utilizando o antígeno do MVV (Institut Pourquier Montpellier, França) em 38 soros de caprinos leiteiros, com uma positividade de 17,7%

(38/214). Saraiva Neto et al. (1995) complementaram o estudo em Pernambuco utilizando para detecção de anticorpos contra o CAEV, pela IDGA, por o mesmo antígeno onde foi observada uma prevalência de 17,6% nas amostras de soros caprinos de Pernambuco (70/397).

Abreu et al. (1998) relataram que a utilização do antígeno proveniente do vírus CAE foi mais eficiente que a do vírus MV na detecção de anticorpos contra CAEV através de IDGA. Dos 120 soros caprinos testados, o Ag CAE classificou 75 como positivos e 45 como negativos, já o Ag MVV classificou 58 como positivos e 17 como negativos, obtendo uma sensibilidade relativa de 77,3%. Dos resultados classificados como negativos, 45 soros apresentaram este resultado frente aos antígenos dos vírus da CAE e MV (Especificidade relativa de 100%). Portanto, os autores recomendam a utilização do antígeno glicoprotéicos e nucleoprotéicos a partir do CAEV, preferencialmente de amostras Brasileiras, para testes de monitoramento (controle e erradicação) dos LVPR em nossos rebanhos.

Pinheiro et al. (2001) coletaram 4019 amostras de soros caprinos leiteiros e nativos SRD do Estado do Ceará para serem testadas na microtécnica de imunodifusão em gel de agar (Kit Comercial – Veterinary Diagnostic Technology, Inc[®]). A prevalência da infecção foi de 1% (40/4019) considerando todos os tipos raciais de caprinos testados. Com relação a prevalência por região do Ceará, constatou-se uma maior prevalência (11,1%) na região metropolitana de Fortaleza, onde existe a bacia caprina leiteira. Esta prevalência representou 57,5% dos animais soropositivos encontrados, sendo, portanto, a maior região de animais infectados pela CAEV.

Leite et al. (2004) pesquisaram no Estado de São Paulo anticorpos anti-CAEV, pela técnica de IDGA utilizando o Ag CAEV, onde obtiveram de um total de 1.030 caprinos, 443 animais soropositivos (43,01%) e 587 animais soronegativos (56,99%).

Lara et al. (2002) compararam três testes (IDGA, IFI, ELISA) para diagnóstico de anticorpos anti-vírus CAE de 168 amostras de soros caprino do Estado de São Paulo. Para o teste de IDGA foram utilizados como antígeno a glicoproteína gp135 (envelope) a proteína p28 (capsídeo) do vírus, para a técnica de ELISA foi utilizado o Chekit CAEV/MVV. O teste de IFI foi realizado utilizando amostras do CAEV do Estado do Rio Grande do Sul. A IDGA detectou 57 animais positivos (33,6%), no ELISA, 75 animais foram positivos (44,6%) e na IFI, 79 animais (47%) foram positivos.

Santin et al. (2002) analisaram os soros do Estado de Goiás para pesquisa de anticorpos anti-gp135 e anti-gp28 pelo teste de IDGA. Das 29 amostras, 10 apresentaram anticorpos anti-gp135 (34,5%), enquanto outras 10 (34,5%) foram consideradas suspeitas. Quanto a p28 não foi observada nenhuma amostra positiva, mas cinco (17,2%) foram consideradas suspeitas. Das amostras suspeitas em relação a p28, quatro foram positivas e uma suspeita no teste contra gp135.

A substituição da Macro-IDGA pela Micro-IDGA pode resultar na redução: da quantidade dos soros padrão e antígenos, do número de placas e do tempo de leitura. Além disso, não há perda na sensibilidade e especificidade do teste.

O teste de IDGA, juntamente com medidas sanitárias e de manejo adequadas, vem apresentando resultados satisfatórios, quando empregado para monitoramento de rebanhos caprinos, reduzindo consideravelmente a prevalência da CAE (ROWE et al., 1992).

2.2.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Existem várias publicações com ELISA para diagnóstico sorológico de LVPR. Nestes ensaios podem ser utilizados como antígeno o vírus inteiro, ou proteínas

recombinantes (ou peptídeos sintéticos). Os ELISAs competitivos são baseados na competição entre anticorpos anti-virais monoclonais com os anticorpos do soro teste.

Para os testes de ELISA que empregam vírus inteiro (WV) como antígeno, os valores da sensibilidade variaram de 92% a 100% e especificidade de 93% a 100%. Para os ELISAs recombinantes a sensibilidade varia consideravelmente de <40% a 100%, e os valores de especificidade tendem a ser altos. Poucos testes de ELISA competitivos tem sido desenvolvidos (de ANDRÉS et al., 2005).

Archambault et al. (1988) utilizaram, no ELISA, um antígeno de vírus inteiro (CAEV) em soros caprinos que já tinham sido testados para p28 no RIA, a sensibilidade e especificidade relativas foram 96.9% e 100%, respectivamente. Simard e Briscoe (1990) desenvolveram um ELISA com antígeno Canadense (vírus inteiro – MVV) tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS), apresentando uma sensibilidade de 94.7% e uma especificidade de 98.8%. Vander Schalie et al. (1994) avaliaram um ELISA (vírus inteiro - CAEV-63) que obteve uma sensibilidade de 94.4% e uma especificidade de 100% em relação à RIPA. Celer et al. (1993) utilizando um ELISA com vírus inteiro (CAEV) encontraram uma sensibilidade e especificidade de 100%, relativa a soros caprinos, onde em um ELISA (MVV) os valores foram de 81% e 87%, respectivamente. Já Zanoni et al., (1994) estudando um ELISA (MVV inteiro) demonstraram uma sensibilidade de 98.6% e uma especificidade de 99.3%, relativa ao teste de 678 soros caprinos de referência determinados por WB e por um ELISA *gag* recombinante. O ELISA (WV) elaborado por Schaller et al. (2000) demonstraram valores de 98.6% e 100% de sensibilidade e de especificidade relativo aos resultados combinados de WB e de um ELISA *gag* recombinante.

Para os ELISAs recombinantes os antígenos utilizados incluem o recombinante *gag* p55, p25, p16, proteína nuclear p14, proteína transmembranar gp46, ou proteína do envelope gp135, purificada. Os peptídeos sintéticos são derivados de p25 ou TM têm sido usados também

Kwang et al. (1993) estabeleceram um ELISA recombinante TM com 97,6% de sensibilidade e 100% de especificidade relativo aos soros de referência no WB. Kwang e Torres (1994) usando, como antígeno, uma combinação de três peptídeos derivados de TM de MVV, encontrou valores de sensibilidade e especificidade 96% e 100%.

Celer et al. (1993) observaram que a sensibilidade do ELISA p25 recombinante era mais baixa do que do ELISA que utiliza como antígeno vírus MVV inteiro (50% *versus* 81%) com especificidade mais alta (100% *versus* 87%). Os valores de sensibilidade e especificidade para um ELISA (CAEV inteiro) foram de 100% e 100%, respectivamente. Zanoni et al. (1994) descreveram que um ELISA com vírus MVV inteiro apresentava uma alta sensibilidade (98,6% *versus* 86,3%) e igual especificidade (99,3%) quando comparado a um ELISA recombinante *gag*-GST.

Power et al. (1995) concluíram em seus resultados que quando o recombinante *gag* (que compreende p25 e 79% de p16) e um ELISA proteína TM eram combinados, a sensibilidade era de 97,4% e a especificidade de 99,4%, relativo ao ELISA com antígeno inteiro (SIMARD e BRISCOE, 1990) foram observadas. O ELISA recombinante foi mais sensível do que o ELISA *gag* (76,6%) ou ELISA TM (94,8%) usados individualmente.

Pasick (1998) usou uma combinação de recombinante *gag* e TM, e encontrou valores de sensibilidade e de especificidade de 98% e 98,8%, respectivamente, relativo ao ELISA com vírus MVV inteiro (SIMARD e BRISCOE, 1990) e 97,9% e 88,2%, relativo ao ELISA com vírus CAEV inteiro (HECKERT et al., 1992).

Os resultados sugerem que os testes de ELISA que empregam como antígeno o vírus inteiro tende a ser mais sensível do que um ELISA recombinante único. Entretanto, a inclusão de um antígeno nuclear ou de envelope ao teste, transformam a sensibilidade e especificidade equivalentes resultados do ELISA com vírus inteiro.

Fevereiro et al. (1999) produziram um ELISA utilizando anticorpos monoclonais para detectar, nos soros ovinos, anticorpos contra vírus Maedi-Visna. A sensibilidade e a especificidade do teste foi de 93% e 100%, respectivamente, relativo à WB, quando comparado com o ELISA utilizando o vírus inteiro obteve-se a sensibilidade e especificidade de 96% e 78%, respectivamente (ZANONI et al., 1994). Recentemente um teste baseado na captura de CAEV-63 por anticorpos monoclonais e medidos pelo deslocamento destes anticorpos por outros do soro teste foi descrito (HERRMANN et al., 2003). A sensibilidade e a especificidade deste ELISA foi determinada, em 200 amostras de soro caprino, como sendo 100% e 96.4% respectivamente, relativo à RIPA.

Capítulo 1

AVALIAÇÃO DE UMA MICROIMUNODIFUSÃO EM GEL DE ÁGAR PARA DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM CAPRINOS

Emmanuela Tiné de ARRUDA¹, Roberto Soares CASTRO², Michele Moreira Martins de OLIVEIRA³, Sérgio Alves do NASCIMENTO⁴, Ana Claudia CAMPOS¹, Sheila Machado GOMES⁵, Miguel Angel FUMAGALLI⁶

RESUMO: As lentiviroses de Pequenos Ruminantes - LVPR (Artrite-encefalite Caprina-CAE e Maedi-Visna), acometem caprinos e ovinos, são caracterizadas por curso lento e progressivo, onde a maioria dos animais acometidos não apresenta sintomatologia clínica, sendo a sorologia a forma mais prática de diagnóstico, pois a presença de anticorpos demonstra indiretamente a existência da infecção por LVPR. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar uma microimunodifusão em gel de ágar (micro-IDGA), que utiliza 10µl de antígeno e soro controle positivo e 30 µl do soro teste, comparativamente a uma macro-IDGA (20µl de todos os reagentes) para ser utilizada no diagnóstico sorológico de LVPR em caprinos, com base na sensibilidade e na especificidade relativas, bem como no índice de concordância ajustada (*Kappa* - *K*). Os cálculos foram feitos de acordo com os resultados do teste de 262 amostras de soros caprinos, colhidos em animais leiteiros de quatro propriedades, localizadas no Rio Grande do Norte (1), Pernambuco (2) e Paraíba (1). Os resultados obtidos revelaram sensibilidade e especificidade relativas de 100% e uma perfeita concordância entre os testes ($K = 1,00$). Dos 262 soros caprinos avaliados através da macro-IDGA e da micro-IDGA, 9,54% (25/262) apresentaram resultados positivos e 90,46% (237/262) resultados negativos em ambos os testes. Ao avaliar as características qualitativas, como a intensidade da linha de precipitação, nitidez e o tempo para determinação de resultados, observou-se que a micro-IDGA apresentou reações mais nítidas que a macro-IDGA, na leitura dos controles positivos feita após 24 horas de incubação, entretanto não houve diferença na leitura realizada após 48 horas. Pelo exposto pode-se concluir que a micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA no diagnóstico sorológico de LVPR e que o tempo de leitura e definição dos resultados pode ser reduzido para 48 horas, sem comprometimento da confiabilidade dos resultados.

Termos para Indexação: Caprinos, diagnóstico, IDGA, CAEV, Maedi-Visna.

MICROIMMUNODIFUSION AVALIATION FOR SMALL RUMINANT LENTIVIRUS DIAGNOSTIC

ABSTRACT: Lentiviroses of Small Ruminants – SRLV (Caprine Arthritis-encephalitis-CAE and Maedi-Visna) affects goat and sheep. It is characterized by a slow and gradual course, where the majority of animals does not present symptoms, and sorology is the most practical mean of diagnosis, where the presence of antibodies demonstrates indirectly the existence of SRLV infection. The aim of this work was to evaluate an agar gel microimmunodifusion (micro-AGID) test in comparison with a macro-AGID test to be used in the serologic diagnosis of SRLV in goats, on the basis of relative sensitivity and specificity, as well as the Kappa index (*k*), calculated in accordance with the results of the

tests. Calculus were performed according to results from 262 goat serum samples, from four properties, located in the Rio Grande do Norte (1), Pernambuco (2) and Paraíba (1). Results presented a relative sensitivity and specificity of 100% and a perfect agreement between the tests ($K = 1,00$). From the 262 goat sera evaluated through macro-IDGA and micro-IDGA, 9,54% (25/262) presented a positive result and 90,46% (237/262) presented a negative result in both tests. Micro-IDGA presented clearer reactions to qualitative characteristics, such as precipitation line intensity, clarity and timing for detection when compared to macro-IDGA, at the reading performed after 24hours of incubation. No alterations were observed after 48h. It can be concluded that, Micro-IDGA may be able to substitute macro-IDGA in the serologic diagnostic of SRLV and that reading time, and results definition may be reduced to 48hours with no decrease in the confidence of results.

Terms for Indexation: Goats, diagnostic, AGID, CAEV, Maedi-Visna

¹Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco (PPGCV - UFRPE) - Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n., Dois Irmãos. CEP – 52171-900, Recife-PE.

²Médico Veterinário, Professor Associado do Depto. de Medicina Veterinária – UFRPE. E-mail rscastro@dmvufrpe.br

³Médica Veterinária, Doutoranda do PPGCV - UFRPE.

⁴Biólogo, Depto. de Medicina Veterinária – UFRPE.

⁵ Médica Veterinária, Depto de Medicina Veterinária - UFRPE.

⁶Acadêmico de Medicina Veterinária da UFRPE.

INTRODUÇÃO

Os caprinos e ovinos podem ser infectados por um grupo de vírus genericamente denominado de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), que compreendem vários isolados, distribuídos em quatro grupos filogenéticos, que compartilham similaridade genética, mecanismo molecular de replicação, morfologia e interação biológica com os hospedeiros. Os protótipos dos dois grupos principais são os vírus Maedi-Visna (MVV), também denominado Pneumonia Progressiva Ovina (OPPV) e o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), originalmente isolados de ovinos e caprinos, respectivamente (SHAH, 2004).

A enfermidade caracteriza-se por longo período de incubação, evolução lenta e progressiva, ficando os animais infectados portadores permanentes do vírus. Esses animais podem apresentar cinco quadros clínicos principais: artrite, encefalite, mamite, pneumonia e emagrecimento crônico (CALLADO et al., 2001). A transmissão dos LVPR ocorre principalmente pela ingestão de colostro e leite de fêmeas infectadas e por via respiratória, mais freqüente em períodos de confinamento. Estudos sugerem que a transmissão vertical deste vírus pode ocorrer em condições naturais, entretanto o mecanismo e a freqüência, não são conhecidos. O sêmen para inseminação artificial e a transferência de embrião representam o menor risco e o risco mínimo, respectivamente (BLACKLAWS et al., 2004). Os animais infectados soroconvertem em diferentes períodos, às vezes tardiamente; há registros de certos casos de sororeversão (RIMSTAD et al., 1993; de ANDRÉS et al., 2005).

A suspeita da infecção por LVPR pode ser feita clinicamente, embora somente uma proporção pequena dos animais desenvolva sinais clínicos, ou de forma mais precisa, através da sorologia. Várias técnicas estão disponíveis para esta finalidade, como a

imunodifusão em gel de ágar (IDGA), os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), a radioimunoprecipitação (RIPA), radioimunoensaio (RIA) e o *western blotting* (WB) (de ANDRÉS et al., 2005). Cada uma apresenta vantagens e desvantagens; assim a decisão de qual teste utilizar depende basicamente das circunstâncias e necessidades específicas.

A IDGA é o teste sorológico mais usado, pois, apresenta boa aceitação pelo baixo custo, boa especificidade e praticidade de execução, porém tem sensibilidade inferior quando comparada ao ELISA, e sua interpretação é relativamente subjetiva, requerendo experiência do executor. Por outro lado, o ELISA é um teste de custos mais elevados do que a IDGA. Ambos os testes são atualmente recomendados pela OIE para certificação (OIE, 2006). Em relação à IDGA, vários protocolos já foram desenvolvidos, usando-se diferentes antígenos, formulações de géis, formato, tamanho e distância entre os poços do molde para perfuração do gel, bem como seu arranjo no molde. Com base na quantidade dos reagentes utilizados, todos referem-se à macro-IDGA¹ (de ANDRÉS et al., 2005).

No Brasil, o teste empregado e que está proposto pelo Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) é a IDGA. Foram desenvolvidos alguns protocolos de macro-IDGA usando-se 100µl de antígeno CAEV (ABREU et al., 1998), que foi aperfeiçoado para 20µl²; 30µl ou 100µl (GOUVEIA et al., 2000). O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar uma micro-IDGA comparativamente a uma macro-IDGA² para ser utilizada no diagnóstico sorológico de LVPR em caprinos.

¹ Para efeito deste artigo foi definido como macro-IDGA o teste realizado com 20µl ou mais do antígeno e do soro controle positivo, e como micro-IDGA aquele realizado com menos de 20 µl.

² Biovetech - Recife, PE, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro IDGA

Produção de Antígeno (Ag)

Foi utilizada a amostra viral padrão CAEV Cork (CAEV-Co), multiplicada em células de cultivo primário, obtidas por explantação de membrana sinovial de feto caprino (MSC). As culturas celulares foram inoculadas, com 3,0ml da suspensão viral por garrafa roller, adicionando-se 200ml de Meio Essencial Mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 2% de soro caprino (SC), e incubadas em estufa a 37°C. No 5º e 10º dia pós-inoculação (PI), procedeu-se a avaliação da camada celular quanto à formação de efeito citopático (ECP). A partir do 10º dia PI, a cada três dias, colhia-se o sobrenadante de cada garrafa, acrescentando-se 200ml de MEM com 2% de SC, este sobrenadante era estocado a -20 °C, até o momento dos passos de purificação.

Após descongelamento dos sobrenadantes, procedeu-se à centrifugação a 3.300g por 30 minutos e diálise em membrana³ contra Polietilenoglicol (PEG 8.000) a 10% em PBS (pH 7,6) a 4°C, durante 48 a 72 horas, até a concentração de aproximadamente 50 - 100 vezes, quando foi coletado e estocado a -20°C (ABREU et al., 1998). O antígeno foi titulado, em diluições duplas, frente ao soro padrão positivo e usado como 2 unidades precipitantes (UP).

Produção do soro padrão positivo (SP)

O Soro Padrão positivo foi preparado a partir do plasma de um animal naturalmente infectado com LVPR, com resultado positivo na macro-IDGA. O plasma foi centrifugado a 3.300g por 30 minutos, a 4°C e diluído, 1:2 (v/v), em solução tampão acetato de sódio

³ THOMAS SCIENTIFIC Swedesboro, NJ, USA (3787-d10) – (33x21mm)

60mM, pH 4,6. Em seguida para cada 2 ml desta solução, foi adicionado 25µl de ácido caprílico resfriado. Esta mistura foi lentamente homogeneizada por 30 minutos a temperatura de 25°C. Posteriormente, foi centrifugada a 3.300g por 30 minutos, a 4°C. Ao sobrenadante foi adicionado PBS 10 vezes concentrado, na proporção de 1:10 (v/v), o pH foi ajustado para 7,6 com hidróxido de sódio (NaOH) 4M e submetido ao fracionamento, utilizando-se solução saturada de sulfato de amônia (PAGE e THORPE, 1998). Após adição do sal, a mistura foi incubada sob agitação constante a 4°C, por 1 hora, e posteriormente centrifugada a 5.000g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado ressuspensão em até 1/4 do volume inicial em PBS pH 7,6, e submetido à diálise por 48 horas, a 4°C, contra PBS pH 7,6, sendo esta solução trocada a cada 4 horas (BRACHT e ISHII-IWAMOTO, 2002). Em seguida o soro padrão positivo foi titulado, em diluições duplas, frente ao antígeno e usado como 2 UP.

Para avaliar a estabilidade dos antígenos e soro controle positivo, alíquotas de 100µl foram descongeladas mensalmente, durante doze meses, e testadas conforme descrito para a micro-IDGA.

Realização dos Testes

A macro-IDGA foi realizada conforme instruções do fabricante⁴. A micro-IDGA foi realizada em placas de Petri⁵ descartáveis, de 90 mm de diâmetro. Cada placa continha 16ml de Agarose⁶ 1% (p/v) em solução tampão borato de sódio (108 mM, pH 8,6). No momento dos testes, o gel foi perfurado com o molde em forma hexagonal (Figura 1.1), de maneira a formar sete poços, sendo um central, onde foi adicionado o Ag, e seis periféricos

⁴ Biovetech, Recife-PE, Brasil.

⁵ Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro – RJ, Brasil.

⁶ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, German.

equidistantes, onde foram adicionados, de forma alternada, o SP e os soros a serem testados. Os poços destinados ao soro padrão positivo e ao antígeno tinham 3mm de diâmetro, com capacidade para 10µl de cada reagente, e os destinados aos soros a serem testados, 5mm (30µl). Todos os poços eram 2mm equidistantes. Terminada a adição dos reagentes, as placas foram incubadas em câmara úmida à temperatura em torno de 25°C e realizadas leitura após 24h, 48h e 72h de incubação. Os soros foram considerados positivos quando ocorria a formação de linha de precipitação entre o poço central (Ag) e o soro testado, apresentando identidade com a linha formada entre o SP e o Ag.

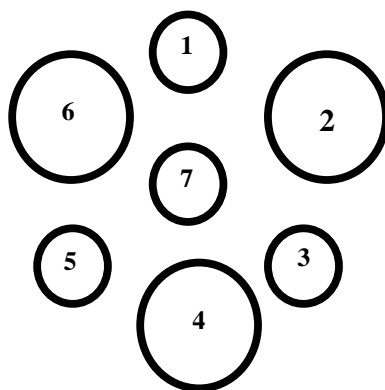


Figura 1.1 - Esquema de molde utilizado para perfuração do gel para micro-IDGA. Poços 1, 3 e 5 (10µl de soro padrão positivo); 2, 4 e 6 (30µl dos soros a serem testados) e 7 (10µl de antígeno).

Comparação da micro e macro-IDGA

A micro-IDGA foi comparada com a macro-IDGA, através do indicador de concordância ajustada *Kappa* (*K*), sensibilidade e especificidade relativas (PEREIRA, 1999), calculados com base no teste de 262 amostras de soros caprinos, colhidos em animais leiteiros de quatro propriedades, localizadas no Rio Grande do Norte (1), Pernambuco (2) e Paraíba (1). Além disso, foram comparadas, qualitativamente, a

intensidade e nitidez das linhas de precipitação de ambos os testes, após 24, 48 e 72 horas de incubação das placas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 262 soros caprinos testados através da macro-IDGA e da micro-IDGA, 9,54% (25/262) apresentaram resultados positivos e 90,46% (237/262) resultados negativos em ambos os testes (Tabela 1.1). Quando comparados os resultados da micro-IDGA em relação aos da macro-IDGA observa-se uma perfeita concordância ajustada *Kappa* entre os dois testes ($k = 1,00$), além de especificidade e sensibilidade relativas de 100%.

Ao avaliar as características qualitativas, como a intensidade da linha de precipitação, nitidez e o tempo para determinação de resultados, observou-se que a micro-IDGA apresentou reações mais nítidas que a macro-IDGA, na leitura dos soros positivos feita após 24 horas de incubação. Entretanto, não houve diferença na leitura realizada após 48 horas de incubação. Recomenda-se, assim emitir os resultados positivos a partir das 24h de incubação e dos negativos a partir de 48h. Classicamente, o tempo de leitura definitiva das placas de IDGA é feita 48 a 72 horas (ADAMS e GORHAM, 1986; ABREU et al., 1998). Neste trabalho pode se observar que utilizando tanto a micro quanto a macro-IDGA este tempo pode ser reduzido para 24 a 48 horas, sem comprometer os resultados, inclusive os de animais que apresentam baixo título de anticorpos anti-LVPR (fracos positivos).

Em testes de imunodifusão ocorre a migração dupla de antígeno e anticorpos, através do gel de ágar. Muitas variáveis podem ser estudadas e modificadas quando se pretende aprimorar este teste, dentre elas pode-se ressaltar: a concentração dos reagentes, os constituintes do ágar e da solução tampão utilizada, o molde para perfuração do gel, desde o formato, até o tamanho e distância entre poços, bem como seu arranjo no molde. O encontro dos reagentes em proporções ótimas leva à formação de complexos antígeno-anticorpo, insolúveis que precipitam, tornando-se visíveis sob a forma de uma linha ou

banda de precipitação. Variação extrema na concentração de antígeno e anticorpo pode alterar a localização ou até inibir a formação da mesma, por isto foram feitas as titulações do antígeno e do soro padrão positivo, ajustando-os para 2 UP. Essa reação pode ainda ser influenciada por condições físico-químicas, como a concentração eletrolítica, a solução tampão empregada na preparação do gel, o pH e a temperatura e/ou pela presença de altos níveis de lipídeos nos soros testes. Na realização de ambas as provas de IDGA foi utilizada agarose com alto grau de pureza, que apresenta um baixo ponto de fusão, o que pode ter sido um fator importante para obtenção de linhas de precipitação nítidas, facilitando a leitura das reações. Além disso, é considerado ponto crítico para o teste de IDGA para LVPR o uso do tampão borato de pH alcalino (WINWARD et al., 1979).

Na micro-IDGA utilizou-se um molde em forma hexagonal com os poços destinados ao antígeno e soro padrão positivo com capacidade para 10 μ l, e os para os soros a serem testados com capacidade para 30 μ l. Este molde tem sido recomendado pela OIE (2005), sem especificação dos volumes dos reagentes, embora não seja feita referência à sua avaliação. O maior volume do soro teste pode permitir a detecção de animais que apresentam baixos títulos de anticorpos, insuficientes para reagir em quantidade suficiente para formar uma linha de precipitação perceptível.

Muitos modelos de molde já foram propostos, porém o que predomina é o de formato hexagonal com poços de igual diâmetro e equidistantes, sendo um poço central, onde se distribui o antígeno, e seis periféricos, onde se distribui alternadamente os soros de referência e os soros a serem testados (CUTLIP et al., 1977; WINWARD et al., 1979; ADAMS & GORHAM, 1986; ABREU et al., 1998; GOUVEIA et al., 2000). O molde usado na micro-IDGA apresenta vantagens, pois torna possível testar mais animais por placa, já que na macro-IDGA são testados 21 soros em sete conjuntos, enquanto na micro-

IDGA são testados 30 soros, e pode-se empregar maior quantidade do soro teste. Além disso, há menor consumo de antígeno e soro padrão positivo, insumos responsáveis, em grande parte, pelo custo do teste, pois é utilizado metade desses reagentes, sem afetar negativamente o resultado.

Tabela 1.1 – Resultado dos testes de macroimunodifusão (Macro-IDGA) e microimunodifusão (Micro-IDGA) para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes

Micro-IDGA	Macro-IDGA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	25	0	25
Negativo	0	237	237
Total	25	237	262

A validade de um teste diagnóstico pode ser estimada com base em seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), que são próprios do teste e não sofrem influência da prevalência da enfermidade para a qual se destina seu uso (ASTUDILLO e KANTOR, 1981). Classicamente, a sensibilidade é definida como o percentual de verdadeiros positivos identificados no teste, e a especificidade o dos verdadeiros negativos, quando comparados com um teste de referência, que pode ser um teste consagrado como *Gold Standard* ou outro de uso clássico. Pelas particularidades da patogênese dos LVPR, a determinação do verdadeiro status dos animais é difícil, pois a restrição da replicação viral torna o isolamento incerto (HECKERT et al., 1992; RIMSTAD et al., 1993; CHEBLOUNE

et al., 1996) e não se dispõe de um teste sorológico *Gold Standard* (de ANDRÉS et al., 2005). Por isso, foi adotado o critério de cálculo da sensibilidade e da especificidade com base nos resultados de uma macro-IDGA, que apresenta sensibilidade de 79,7% e especificidade de 100%, (relativas a um ELISA-i), que é rotineiramente usada no país. Assim, considerando a perfeita concordância entre a micro e a macro-IDGA, esses valores podem ser aplicados à micro-IDGA.

Nos testes de IDGA para LVPR a sensibilidade e especificidade são dependentes do tipo de antígeno empregado. Os antígenos utilizados neste trabalho foram produzidos em células de MS infectadas com CAEV Co, constituído principalmente de nucleoproteína viral, pois tem-se observado que os testes com antígeno CAEV são mais sensíveis do que aqueles com MVV (KNOWLES et al. 1994; ABREU et al., 1998). Por outro lado, Adams e Gorham (1986) afirmam que o teste utilizando a glicoproteína de superfície (gp135) do vírus CAEV é mais sensível do que os que empregam a nucleoproteína (p28), porém Knowles et al. (1994) observaram sensibilidade e especificidade de 91% e 100%, respectivamente, quando utilizaram como antígeno o vírus inteiro CAEV-63. A relativa instabilidade das glicoproteínas virais (RIMSTAD et al, 1994) justifica a utilização da nucleoproteína na constituição de *kits*, que têm se mostrado bastante estáveis. Neste trabalho, isto ficou evidente na prova de estabilidade de longa duração, onde após um ano não houve redução do título do antígeno.

Finalmente, em consonância com a preocupação com a bioética e a biossegurança, a tecnologia usada na micro-IDGA reduzirá a quantidade de soro controle positivo, que é colhido de caprino naturalmente infectado por CAEV. Isto implica no uso de menor número de animais, o que está de acordo com os preceitos de bem estar animal, e na manipulação menos freqüente de células e animais infectados pelo vírus, que, apesar de não

ser considerado infectante para o homem, deve ser objeto de atenção, pois é um vírus altamente mutável. Além disso, como regra geral de prevenção à exposição a agentes infecciosos, é importante destacar que agentes desconhecidos podem infectar os animais sem serem detectados, impondo algum tipo de risco aos que os manipulam, devendo-se assim limitar ao máximo o uso de animais.

CONCLUSÕES

1. A micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA, no diagnóstico sorológico de LVPR, diminuindo os custos do teste.
2. O tempo de leitura dos resultados da macro e micro-IDGA utilizadas pode ser de 24 a 48 horas, sem comprometimento da confiabilidade dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com o apoio da FACEPE e do MCT/FINEP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O. et al. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n. 2, p.57-60, abril. 1998.

ADAMS, D. S.; GORHAM, J. R. The gp135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodifusion serology. **Research in Veterinary Science**, London, v. 40, p. 157-160, 1986.

ASTUDILLO, V.M.; KANTOR, I.N. El problema de la validez de una prueba diagnostica para uso masivo como procedimiento estadistico de clasificación. **Boletim del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v.43-44, p. 37-43,1981.

BLACKLAWS, B.A. et al. Transmission of small ruminant lentiviruses **Veterinary Microbiology**, Amsterdam – The Netherlands, v.101, p. 199-208, julho. 2004.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri-SP: Ed. Manole, p. 77-192, 2002.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 87-97, jul./set., 2001.

CHEBLOUNE, Y. et al. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in fibroblast cell culture. **Virology**, New York, v. 222, p. 21-30, agosto. 1996.

CUTLIP, R.C.; JACKSON, T.A.; LAIRD, G.A. Immunodifusion test for ovine progressive pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.38, p. 1081-1084, 1977.

de ANDRÉS, D. et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses **Veterinary Microbiology**, Amsterdam – The Netherlands, v.107, p. 49-62, abril. 2005.

GOUVEIA, A.M.G. et al. Microimunodifusão em gel de agar para o diagnóstico sorológico de infecção pelo lentivírus de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2000, Águas de Lindóia, SP. **Resumo...** CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2000, p. 27-27.

HECKERT, R.A. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 56, p. 237-241. 1992.

KNOWLES, D.P. et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 243-245, 1994.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2006. Disponível em <<http://www.oie.int>>, Acesso em 10 de maio de 2006.

PAGE, M., THORPE, R. **Methods in Molecular Biology: Immunochemical protocols**. 2ed. v.80, p.95-111, 1998.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 596p.

PNSCO. Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina. Instrução Normativa nº 37, de 10 de dezembro de 2004, publicada no Diário Oficial da União de 20/12/2004, seção 1, página 21.

RIMSTAD, E. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.54, p. 1858-1862, 1993.

RIMSTAD, E. et al. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **Archives of Virology**, v.134, p.345-356, setembro. 1994.

SHAH, C. et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and world propagation through livestock trade. **Virology**, New York, v.319, p. 12-26, fevereiro. 2004.

WINWARD et al. Microimmunodiffusion Test for Diagnosis of Ovine Progressive Pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.40, n. 4, p. 564-566, 1979.

3 Conclusões Finais

1. A micro-IDGA pode substituir a macro-IDGA, no diagnóstico sorológico de LVPR, diminuindo os custos do teste.
2. O tempo de leitura de resultados pode ser reduzido para 24-48 horas, sem comprometimento da confiabilidade dos resultados.

4 Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S.R.O. **Isolamento de um vírus sincicial caprino (amostra RPE – 03) e comparação da sensibilidade e especificidade relativas do antígeno Maedi/Visna frente ao antígeno AEC (amostra Co) em teste de IDGA.** 1996. 64 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996. Recife.

ABREU, S. R. O. et al. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e comparação com o do vírus Maedi- Visna para utilização em teste de imunodifusão em agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n. 2, p.57-60, abril. 1998.

ADAMS, D.S. et al. Immune response of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v. 28, p. 421-427, 1980.

ADAMS, D.S. et al. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, p. 1670-1675, 1983.

ADAMS, D. S.; GORHAM, J. R. The gp135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. **Research in Veterinary Science**, London, v. 40, p. 157-160, 1986.

ALMEIDA, M.G.A.R et al. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no Estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.1, n.3, p.78-83, 2001.

ALVES, F.S.F; PINHEIRO, R.R. Presença da Artrite-Encefalite Caprina a vírus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997. Gramado. **Resumo...** Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p. MVP 008.

ANDRIOLI, A. et al. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte - MG, v. 23, n. 3, p. 420-423, 1999.

ARCHAMBAULT, D. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n.5, p. 971-975, 1988.

ASSIS, A.P.M.V.; GOUVEIA, A.M.G. Evidência sorológica de lentivirus (Maedi Visna/CAE) em rebanhos nos Estados do MG, RJ, BA e CE. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: 1994. p 46.

ASTUDILLO, V.M.; KANTOR, I.N. El problema de la validez de una prueba diagnóstica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación. **Boletim del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa**, Rio de Janeiro, v.43-44, p. 37-43, 1981.

BANKS, K.L. et al. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 44, p. 2307-2311, 1983.

BLACKLAWS, B.A. et al. Transmission of small ruminant lentiviruses **Veterinary Microbiology**, Amsterdam – The Netherlands, v. 101, p. 199-208, julho. 2004.

BLONDIN, I.; GRILLET, C.; THIOGANE, Y. Formation de syncytia en cultura et analyse de la composition protéique de plusieurs souches de virus de l'artrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV). **Annales Recherche Vétérinaire**, v. 20, p. 153-158, 1989.

BRACHT, A.; ISHII-IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em bioquímica**. Barueri-SP: Ed. Manole, p. 77-192, 2002.

BRODIE, S.J. et al. Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus – induced lymphoid interstitial pneumonia. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 166, p. 531-541, 1992.

BRODIE, S. J. et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 250-263, 1995.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): Revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 87-97, jul./set., 2001.

CAMPOS, K.M.T. et al. Levantamento Sorológico de Ovinos Santa Inês Localizados em Rebanhos do Estado de Pernambuco através da Técnica de Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA), para Determinação de Lentivírus de Pequenos Ruminantes. In: III JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UFRPE, 2003, Recife: **Anais...** Recife, 2003.

CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; ABREU, S.R.O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 46, n. 5, p. 571-572, 1994.

CASTRO, R.S. Efeito da CAE (Artrite Encefalite Caprina) na Saúde e Produtividade de Cabras Leiteiras. V ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA (ENDEC), 1998.

CASTRO, R.S. et al A Labelled Avidin-Biotin ELISA to Detect Antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis Virus in Goats Sera. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht – The Netherlands, v. 23, p. 515-522, dezembro.1999.

CASTRO, R.S.; MELO, L.E.H. CAEV e Maedi-visna: Importância na saúde e produtividade de caprinos e ovinos e a necessidade de seu controle no Nordeste brasileiro. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 4, n. 2/3, p. 315-321, 2001.

CASTRO, R.S. et al. Anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em animais sem raça definida (SRD) de abatedouros dos Estados de Pernambuco e Paraíba. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.5, n. 2/3, p. 121-123, maio/dez., 2002.

CELER Jr, V.; ZANONI, R.; PETERHANS, E. Comparison of various antigens in the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus using the ELISA test. **Veterinary Medicine (Praha)**, Lenexa, v. 38, p. 237-244, 1993.

CELER Jr, V. et al. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole vírus ELISA and AGID test. **Zentralbl Veterinarmed [B]**, Stuttgart, v.45, p.183-188, 1998.

CELER Jr, V et al. The detection of proviral DNA by semi-nested polymerase chain reaction and phylogenetic analysis of Czech maedi-visna isolates based on *gag* gene sequences. **Journal Veterinary Medicine [B]**, v.47, p.203-215, 2000.

CHEBLOUNE, Y. et al. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in fibroblast cell culture. **Virology**, New York, v. 222, p. 21-30, agosto. 1996.

CLEMENTS, J.; PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v.32, p. 97-109, maio.1994.

COFFIN, J.M. Retroviridae: The virus and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M.; CHANOCK, R.M.; MELNICK, J.L.; MONATH, T.P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. Fields **Virology**, New York, p. 1767-1847, 1996.

CONSTABLE, P.D. et al. Visna-like in a ram with chronic demyelinating encephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 208, p. 117-120, 1996.

CORDIER, G et al. In vivo activation of alveolar macrophages in ovine lentivirus infection. **Clinical Immunology Immunopathology**, v. 55, p. 355-367, 1990.

CORK, L.C. et al. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 129, p. 134-141, 1974.

CORK, L.C.; NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. I –Persistent viral infection with progressive pathologic changes. **Laboratory Investigation**, v. 42, n. 6, p. 596-602, 1980.

CRAWFORD, T. B. et al. Chronic arthritis in goats caused by a Retrovírus. **Science**, v. 207, p. 997-999, 1980.

CUNHA, R.G.; NASCIMENTO, M.D. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 2, p.72-75, 1995.

CUTLIP, R.C.; JACKSON, T.A.; LAIRD, G.A. Immunodifusion test for ovine progressive pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.38, p. 1081-1084, 1977.

CUTLIP, R.C.; JACKSON, T.A.; LEHMKUHL, H.O. Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 40, n. 10, p. 1370-1374, 1979.

CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D., JACKSON, T.A. Intrauterine transmission of progressive pneumonia virus. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, p. 1795-1797, 1981.

CUTLIP, R.C. et al. Effects on ovine fetuses of exposure to ovine progressive pneumonia virus. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 43, p. 82-85, 1982.

D'ANGELINO, J.L. et al. Ocorrência da artrite-encefalite caprina no Estado de São Paulo - Brasil. **Arq. EMV-UFBA**, Salvador, v.16, n.1, p. 60-66, 1993.

DAVIES, J.M.; ROBINSON, W.F.; CARNEGIE, P.R. Antibody reactivity to the transmembrane protein of the caprine arthritis-encephalitis virus correlates with severity of arthritis: no evidence for the involvement of epitope mimicry. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 60, p. 131-147, dezembro.1997.

de ANDRÉS, D. et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses **Veterinary Microbiology**, Amsterdam – The Netherlands, v.107, p. 49-62, abril. 2005.

DeMAAR, T.W.; BLUMER, E.S.; SHERMA, D.M. Failure of horizontal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus to non-dairy breeds of goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam – The Netherlands, v. 17, p. 197-198, agosto. 1995.

de la CONCHA-BERMEJILLO A. et al. Pathologic and serological responses of isogenic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal of Acquired Immune Deficient Syndrome and Human Retrovirology**, v. 8, p. 116-123, 1995.

de la CONCHA-BERMEJILLO, A. et al. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 57, p. 684-688, 1996.

de la CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13, p. 12-33, 1997.

ELLIS, I.A.; DeMARTIN, I.C. Immunomorphologic and morphometric changes in pulmonary lymphnodes of sheep with progressive pneumonia. **Veterinary Pathology**, v. 22, p. 32-41, 1985.

FEVEREIRO, M.S.; BARROS, S.; FAGULHA, T. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against maedi-visna virus. **Journal of Virology Methods**, v.81, p.101-108, 1999.

FIENI, F. et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. **Theriogenology**, New York, v.57, p.931-940, janeiro. 2002.

FIENI, F. et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, New York, v.59, p.1515-1523, abril. 2003.

FRANKE, C.R. **Controle Sanitário da Artrite-encefalite Caprina (CAE)**. Salvador: EDUFBA, 1998. 70p.

FROTA, M.N.L. et al. Artrite Encefalite Caprina em cabritos de rebanhos com Programa de Controle no Estado do Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.147-152, abr./jun., 2005.

GARCIA, M.; GALHARDO, M.; ARAÚJO, W.P.; D'ANGELINO, J.L.; BASTOS, P.S.; ROSSINI, A.J. Caprine arthritis encephalitis (CAE): occurrence of positive sera in goats raised in Brasil. **Tropical Animal Health And Production**, Edinburgh, v.24, p. 164, setembro. 1992.

GAZIT, A. et al. Two species of Rev proteins, with distinct N termini, are expressed by Caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Virology**, v. 70, p. 2674-2677, 1996.

GENDELMAN, K.E. et al. Tropism of sheep lentivirus for monocyte: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **Journal of Virology**, v. 58, p. 67-74, 1986.

GEORGSSON, G. et al. Experimental visna in foetal Icelandic sheep. **Journal of comparative pathology**, New York, v. 88, p. 597-605, abril. 1978.

GOGOLEWSKI, R.P. et al. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. **Journal of General Virology**, London, v. 66, p. 1233-1240, 1985.

GOURDOU, I. et al. The open reading frame S of visna genome is a trans activating gene. **Virology**, New York, v. 171, p. 170-178, julho. 1989.

GOUVEIA, A.M.G. et al. Microimunodifusão em gel de agar para o diagnóstico sorológico de infecção pelo lentivírus de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2000, Águas de Lindóia, SP. **Resumo...** CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2000, p. 27-27.

GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 22, p. 71-87, fevereiro. 1995.

HARMACHE, A. et al. The *vif* gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. **Journal of Virology**, v. 69, p. 3247-3257, 1995.

HAZIZA, B. et al. Caprine arthritis encephalitis virus: Evidence for a B/D type assembly pathway in a C-type lentivirus replication. **Virology**, New York, v. 286, p. 434-445, agosto. 2001.

HECKERT, R.A. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 56, p. 237-241.1992.

HERRMANN, L.M. et al. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 267-271, 2003.

HOUWERS, D. I. Epidemiology, diagnosis and control of SRLV-infections. In: **3rd EUROPEAN WORKSHOP ON OVINE AND CAPRINE RETROVIRUSES**, Jaca, Espanha, março. 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo dos Rebanhos, segundo as grandes regiões e Unidades da Federação**, Brasil, 2004. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>, Acesso em 14 de maio de 2006.

KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVERS, W.P. Characterization of infection of caprine synovial membrane cells by retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. **Virology**, New York, v. 110, p. 113-119, abril. 1981.

KNOWLES, D.P. et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 243-245, 1994.

KWANG, J. et al. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 5, p. 189-193, 1993.

KWANG, J.; TORRES, J.V. Oligopeptide-based enzyme immunoassay for ovine lentivirus antibody detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1813-1815, 1994.

LAMARA, A et al. Efficient replication of caprine arthritis – encephalitis virus in goat granulosa cell. **Virus Research** , v. 79, p. 165-172, novembro. 2001.

LAMARA, A et al. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis – encephalitis virus (CAEV) **Theriogenology**, New York, v.58, p. 1153-1163, outubro. 2002a.

LAMARA, A . et al. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis – encephalitis virus (CAEV) **Virus Research**, v. 87, p. 69-77, julho. 2002b.

LARA, M.C.C.H. et al. Identificação Imuno-Sorológica de Anticorpos Anti-Vírus da Artrite-Encefalite dos Caprinos: Comparação das Técnicas de Imunodifusão em Gel de Ágar, Ensaio Imunoenzimático e Imunofluorescência Indireta. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 1-5, out/dez. 2002.

LEITE, B.L.S. et al. Avaliação da Taxa de Ocorrência da Artrite-Encefalite Caprina a Vírus pelas Regionais do Escritório de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, Brasil, e seu Mapeamento por Meio de Sistema de Informações Geográficas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 21-26, jan./ mar., 2004.

LEITE, E.R. **Ovinocaprinocultura no Nordeste - Organização e Crescimento**. Embrapa Caprinos. Sobral: 2006. Disponível em < <http://www.cnpc.embrapa.br> > , Acesso em 20 de abril de 2006.

LE JAN, C. et al. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after in vitro infection by caprine arthritis encephalitis virus. **Research in Veterinary Science**, London, v. 69, p. 225-231, dezembro. 2000.

LERONDELLE, C.; FLEURY, C.; VIALARD, J. La glande mammaire: organe cible de l'infection por la virus de l'arthrite et de l'écéphalite caprine. **Annales Recherche Vétérinaire**, Versailles, v. 20, p. 57-64, 1989.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J.F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Virus Research**, v. 30, p. 467-474, 1999.

LE ROUX, C. et al. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. **Archives of Virology**, v. 140, p. 1-11, janeiro. 1995.

LÚJAN, L., BEGARA, I., COLLIE, D. et al. Ovine lentivirus (maedi-visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. **Veterinary Pathology**. v. 31, p. 695-703, 1994.

MELO, A.C.M.; FRANKE, C.R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 113-117, 1997.

MOOJEN V. et al. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi-Visna/Artrite-Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 1, p. 77-78, 1986.

MSELLI-LAKHAL, L. et al. Defective RNA packaging is responsible for low transduction efficiency of CAEV based vectors. **Archives of Virology**, v. 143, p. 681-695, abril. 1998.

MSELLI-LAKHAL, L. et al. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. **Virology**, New York, v. 259, p. 67-73, junho.1999.

MSELLI-LAKHAL, L. et al. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis encephalitis virus from infecting human cells. **Journal of Virology**, v. 74, p. 8343-8348, 2000.

MURPHY, F.A et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Archive of Virology**, sup.10, p. 193-204, 1995.

NARAYAN, O. et al. Visna virus infection of American lambs. **Science**, Washington, v. 183, p. 1202-1203, 1974.

NARAYAN O. et al. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **Journal of General Virology**, London, v. 50, p. 69- 79, 1980.

NARAYAN, O. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna virus of sheep and goats. **Journal of General Virology**, London, v. 59, p. 346-356, 1982.

NARAYAN O. et al. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection of Immunity**, v. 41, p. 67-73, 1983.

NOGUEIRA FILHO, A.; ALVES, M. **Potencialidades da cadeia produtiva da ovinocaprinocultura na região nordeste do Brasil**. Banco do Nordeste do Brasil. Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – ETENE, 2002.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2006. Disponível em <<http://www.oie.int>>, Acesso em 10 de maio de 2006.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Anticorpos contra Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos e ovinos em abatedouros do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, p.947-949, outubro. 2006.

OLIVER, R.E.; GORHAM, J.R.; PARISH, S.F. et al. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 42, p. 1554-1559, 1981.

OLIVER, R.; CATHCART, A.; McNIVEN, R. POOLE, W.; ROBATI, G. Infection of lambs with caprine arthritis encephalitis virus by feeding milk from infected goats. **Veterinary Record**, London, v. 116, p. 83, 1985.

PAGE, M., THORPE, R. **Methods in Molecular Biology: Immunochemical protocols**. 2ed. v.80, p.95-111, 1998.

PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canadá, v. 62, p. 241-244, 1998.

PEPIN, M., et al. Maedi-Visna Virus infection in sheep: a review. **Veterinary Research**, v. 9, n. 34, p. 341-367, 1998.

PEREIRA, M.F. **Artrite-Encefalite caprina a vírus (CAE) – estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas, 1995, 64p. Dissertação.** (Mestrado em Ciência Veterinária) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.

PEREIRA, M.G. **Epidemiologia: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 596p.

PÉRETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le CAEV: Revue des consequences pratiques. **Revue Méd. Vét.**, local, v. 144, n. 2, p. 93-98, 1993.

PHELPS, S.L.; SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis virus infection. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 203, p. 1663-1666, 1993.

PINHEIRO, R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31 n.3, p.449-454, junho. 2001.

PNSCO. Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina. Instrução Normativa nº 37, de 10 de dezembro de 2004, publicada no Diário Oficial da União de 20/12/2004, seção 1, página 21.

POWER, C.; RICHARDSON, S.; BRISCOE, M.; PASICK, J. Evaluation of two recombinant maedi-visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 2, p. 631-633, 1995.

QUERAT, G. et al., Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. **Journal of Virology**, Washington, v.52, n. 2, p. 672-679, fevereiro, 1984.

RAVAZZOLO, A.P. et al. Evidência de infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite caprina em caprinos de alguns Municípios do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10, 1998, **Resumo...** Porto Alegre: Sovergs, 1988, p.68.

RAVAZZOLO, A.P. et al. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goat infection in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. **Virology**. New York, v. 350, p.116-127, julho. 2006.

RIMSTAD, E. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.54, p. 1858-1862, 1993.

RIMSTAD, E. et al. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **Archives of Virology**, v.134, p.345-356, setembro.1994.

ROLLAND, M. et al. Characterisation of an Irish caprine lentivirus strain – SRLV phylogeny revisited. **Virus Research**, v. 85, p. 29-39, abril. 2002.

ROWE, J.D. et al. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairy. **American Journal Veterinary Research**, v.53, n. 12, p. 2386-2395, 1992.

ROWE, J.D.; EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of Caprine Arthritis- Encephalitis virus infection. **Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 13 p. 34-53, 1997.

RUSSO, P.; VITU, C.; GUEGUEN, F. La maladie maedi-visna du mouton: revue et perspectives. **Le Point Vétérinaire**, v. 23, p. 33-38, 1991.

SALTARELLI, M.J. et al. Identification of the caprine arthritis encephalitis virus Rev protein and cis-acting Rev-responsive element. **Virology**, New York, v. 199, p. 47-55, fevereiro. 1994.

SAMAN, E. et al. A new sensitive assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, p. 734-740, 1999.

SANTIN, A.P.I et al. Artrite encefalite caprina: Identificação de animais soropositivos no Estado de Goiás **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 67-71, jan./jun. 2002.

SARAIVA NETO, A.O. et al. Estudo soro-epidemiológico da Artrite-encefalite Caprina em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Soropédica – RJ, v.15, n. 4, p.121-124, 1995.

SCHALLER, P. et al. Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.** v. 142, p. 145-153, 2000.

SCHOBORG, R.V.; SALTARELLI, M.J.; CLEMENTS, J.E. A Rev protein is expressed in caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) – infected cells and is required for efficient viral replication. **Virology**, New York, v. 202, p. 1-15, julho. 1994.

SHAH, C. et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and world propagation through livestock trade. **Virology**, New York, v.319, p. 12-26, fevereiro. 2004.

SILVA, J.S. et al. Ocorrência da artrite encefalite caprina (CAEV) no município de Apodi-RN. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28, 2001, Salvador. **Anais...** Salvador, p.180. Resumo.

SILVA, J.S. et al. Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina em rebanhos caprinos leiteiros no Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador. **Anais...** Salvador, p.43. Resumo.

SIMARD, C.L.; BRISCOE, M.R. An enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II Comparasion to conventional Agar Gel Immunodifusion test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Canada, v. 54, p. 451-456, 1990.

SKRABAN, R.; MATTHÍASDÓTTIR, S., TORSTEINSDÓTTIR, S. et al. Naturally occurring mutations within 39 amino acids in the envelope glycoprotein of maedi-visna virus alter the neutralization phenotype. **Journal of Virology**, v. 73, n. 10, p. 8064-8072, 1999.

SMITH, M.C.; CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. Schaumburg, v. 193, p. 63-67, 1988.

SOTOMAIOR, C.; MILCZEWSKI, V. Relato de um rebanho ovino infectado pelo vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. **Resumo...** Gramado: 1997, p.179.

TEIXEIRA, M.F.S., LAMBERT, V., MSELLI-LAKAHL, L., et al., Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentivirus. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 58, n. 6, p. 579-583, 1997.

TORFASON, E.G.; GUDNADOTTIR, M.; LOVE, A. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of visna-maedi. **Archives of Virology**. v. 123, p. 47-58, março. 1992.

TRAVASSOS C.E. et al. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in white blood mononuclear cells and semen of experimentally infected bucks. **Veterinary Research**. v. 29, p. 579-584, 1998.

TRAVASSOS, C.E.P.F.; SILVA, A.G.; PERRIN, G. Presença do vírus da artrite-encefalite caprina na forma de partículas virais livres e infecciosas no líquido seminal de caprinos positivos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro, v. 6, n. 1, p. 36-39, 1999.

VANDER SCHALIE, J. et al. Evaluation of a kinetic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of caprine arthritis-encephalitis virus – specific antibodies. **Journal of veterinary diagnostic investigation** v. 6, p. 30-33, 1994.

VAREA, R. et al. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 13, p. 301-307, 2001.

VITU, C. et al. An ELISA test for detection of maedi-visna antibodies: comparative study with gel immunodiffusion and complement- fixation test. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v.5, p. 469-481, 1982.

WATT, B.J.; SCOTT, P.; COLLIE, D.D.S. Maedi-visna virus infectious in practice. **In Practice**, p. 239-247, set, 1994.

WINWARD et al. Microimmunodiffusion Test for Diagnosis of Ovine Progressive Pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.40, n. 4, p. 564-566, 1979.

ZANONI, R.G. et al. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. **Zentralbl Veterinarmed [B]**, Stuttgart, v. 41, p. 662-669, 1994.

ZHANG, Z. et al. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Journal of virological methods**, v. 86, p. 13-20, 2000.