

SÉRGIO ALVES DO NASCIMENTO

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA EMPREGANDO CULTIVO DE CÉLULAS
CorFC COM BAIXO TEOR DE SORO FETAL BOVINO**

RECIFE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA EMPREGANDO CULTIVO DE CÉLULAS
CorFC COM BAIXO TEOR DE SORO FETAL BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Castro.

RECIFE

2016

Ficha catalográfica

N244p Nascimento, Sérgio Alves do

Produção de antígenos para diagnóstico da artrite encefalite caprina empregando cultivo de células CorFC com baixo teor de soro fetal bovino / Sérgio Alves do Nascimento. – Recife, 2016.
72 f. : il.

Orientador: Roberto Soares de Castro.

Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Medicina Veterinária, Recife, 2016.

Referências.

1. RPMI 1640
 2. CAEV
 3. IDGA
 4. Células de córnea
 5. Caprino
- I. Castro, Roberto Soares de, orientador II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS PARA DIAGNÓSTICO DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA EMPREGANDO CULTIVO DE CÉLULAS
CorFC COM BAIXO TEOR DE SORO FETAL BOVINO**

Tese de Doutorado elaborada por

SÉRGIO ALVES DO NASCIMENTO

Aprovada em 23/02/2016

BANCA EXAMINADORA



Professor Dr. Roberto Soares de Castro

Orientador - Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE



Professora Dra. Ana Cláudia Campos

Núcleo de Medicina Veterinária do Sertão - UFS



Professora Dra. Andréa Alice da Fonseca Oliveira

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE



Professor Dr. Huber Rizzo

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE



Professor Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

DEDICATÓRIA

Longas foram às caminhadas a vazante maré...

AGRADECIMENTOS

A Deus e a São Judas Tadeu meu refúgio e devoção.

Aos meus pais pelo respeito e afeição.

A família, essência de vida.

Ao amigo e orientador, Professor Dr. Roberto Soares de Castro, pela atenção e ensinamentos.

Aos parceiros Luiz Cosme e Karin Florêncio presentes no dia a dia.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente, ajudaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho desenvolver testes sorológicos (IDGA e ELISA indireto - ELISAI) utilizando antígenos do vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) obtidos a partir de uma linhagem de células de córnea caprina (células CorFC) cultivada com 0,1% de SFB. Para a IDGA foram obtidos antígenos a partir de células cultivadas em MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640. Das 163 amostras de soros testados (28 positivas e 135 negativas), 28 (17,17%) apresentaram resultados positivos para o Ag MEM e Ag DMEM/12 e 29 (17,79%) para o Ag RPMI 1640. Comparando-se os resultados obtidos com os três Ag foi observada concordância ajustada de kappa quase perfeita (0,98 a 1,00). O antígeno Ag RPMI 1640, que apresentou melhor qualidade das linhas de precipitação na IDGA e melhor rendimento foi avaliado comparativamente com um Ag comercial (Kit para diagnóstico de CAE – IDGA; Unika biotech, Recife). O teste dos 797 soros com o Ag comercial apresentou 216 positivos e 581 negativos; com o Ag RPMI 1640 foram observados 225 resultados positivos e 572 negativos, correspondendo a sensibilidade (Se) e especificidade (Es) relativas de 100% e 98,45%, respectivamente. De forma global, houve uma concordância ajustada (kappa = 0,97) quase perfeita entre os resultados com ambos Ag. Para o ELISAI foram empregados antígenos virais nativos obtidos por um processo simples (clarificação, diálise e tratamento com triton X-100) a partir de células cultivadas em meio RPMI 1640. Após a padronização foram feitas as avaliações de desempenho do ELISAI. Ao avaliar a repetibilidade do ELISAI RPMI observou-se o CV entre placas de 4,4 e 17,3 e entre dias de 5,1 e 18,4, para soros negativo e positivo, respectivamente. Os resultados dos 722 soros testados com os Kits para diagnóstico de LVPR IDGA/ELISAI comerciais (Unika biotech, Recife) apresentou 166 positivos e 556 negativos; com o ELISAI RPMI foram observados 171 resultados positivos e 551 negativos, correspondendo a Se e Sp relativas de 97,59% e 98,38%, respectivamente, com concordância ajustada kappa de 0,95, considerada quase perfeita. Esses resultados demonstram que pode-se estabelecer uma IDGA e um ELISA para diagnóstico de LVPR altamente sensíveis e específicos utilizando-se um modelo simplificado para obtenção de antígenos, empregando células CorFC cultivadas com baixo teor de SFB. Dependendo do tipo de célula e meio utilizado pode-se produzir antígenos de LVPR com baixo teor de SFB, que corrobora com o bem estar animal, representa redução de custos com insumos e nos processos de purificação de proteínas.

Palavras-chave: RPMI 1640, CAEV, IDGA, células de córnea, caprino

ABSTRACT

The objective of this work is to develop serological tests (AGID and ELISA -ELISAI) using antigens of the virus Arthritis Encephalitis Goat (CAEV) obtained from a goat corneal cell line (CorFC cells) grown with 0.1% FBS. For AGID antigens were obtained from cells cultured in MEM, DMEM / F12 and RPMI 1640. Of the 163 tested sera samples (28 positive and 135 negative), 28 (17.17%) were positive for MEM and Ag Ag DMEM / 12 and 29 (17.79%) to Ag is RPMI 1640. Comparing the results obtained with three Ag was observed almost perfect agreement kappa adjusted (0.98 to 1.00). The Ag RPMI 1640 antigen, which showed better quality of precipitation lines in AGID and best performance was evaluated in comparison to a commercial Ag (Kit for the diagnosis of CAE - AGID; Unika biotech, Recife). The test of 797 sera with commercial Ag showed 216 positive and 581 negative; RPMI 1640 with Ag were observed 225 positive and 572 negative, corresponding to sensitivity (Se) and specificity (Es) for 100% and 98.45%, respectively. Globally, there has been adjusted (kappa = 0.97) between the almost perfect results with both Ag. For ELISAI empregandos native viral antigens were obtained by a simple process (clarification, dialysis and the treatment with triton X-100) to from cells cultured in RPMI 1640. After standardization were made the ELISAI performance evaluations. To assess the repeatability of the observed ELISAI RPMI CV entreplacas 4.4 and 17.3 and between 18.4 and 5.1 days for negative and positive sera. The results of 722 sera tested with the kits to diagnose LVPR AGID / commercial ELISAI (Unika biotech, Recife) showed 166 positive and 556 negative; with RPMI were observed ELISAI 171 positive and 551 negative, and if Sp corresponding to about 97.59% and 98.38%, respectively, with agreement adjusted kappa 0.95, considered almost perfect. These results demonstrate that one can establish an AGID an ELISA for highly sensitive and specific diagnosis of LVPR using a simplified model for obtaining of antigens, employing CorFC cells with low levels of FBS. Depending on the cell type and medium used can be produced LVPR antigens with low FCS content, which agrees with the animal welfare, represents a reduction of input costs and protein purification processes.

Keywords: RPMI 1640, CAEV, AGID, corneal cells, goats

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR)	14
3.1.1 Classificação	14
3.1.2 Estrutura	14
3.1.3 Replicação	15
3.1.4 Tropismo celular	16
3.1.5 Diagnóstico	17
3.2 Cultura celular	18
3.2.1 Aplicações	18
3.2.2 Células em cultivo	19
3.2.3 Subcultura	20
3.2.4 Meios	20
3.2.5 Suplementos	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
5. EXPERIMENTO I	
Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células de córnea de feto caprino (CorFC) cultivadas em meios suplementados com baixo teor de soro fetal bovino.	44
6. EXPERIMENTO II	
Desenvolvimento de ELISA indireto para diagnóstico da CAE empregando antígenos obtidos a partir de células CorFC com baixo teor de soro fetal bovino.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do MLS. 21

Tabela 2 - Composição de três tipos de meios frequentemente utilizados em culturas de células. 22

Tabela 3 - Composição do Soro Fetal Bovino. 26

LISTA DE ABREVIATURAS

CA - Capsídeo

CAE – Artrite-encefalite caprina

CAEV – Vírus da artrite-encefalite caprina

CV – Coeficiente de variação

CorFC – Córnea de feto caprino

DNA – Ácido desoxiribonucléico

DMEM/F12 - Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient mixture

ECP – Efeito Citopático

EIE – Ensaio imunoenzimático

ELISA – Enzyme linked immunosorbent assay

ICAP – Partículas intra-citoplasmáticas

IDGA – Imunodifusão em gel de agar

IgG – Imunoglobulina da classe G

IN - Integrase

kDa – Kilo Daltons

LTR – Long terminal repeat

LVPR – Lentivírus de pequenos ruminantes

MA – Proteína da matriz

Mg – Magnésio

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

MLS – Meio Livre de Soro

mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro

MSC – Membrana Sinovial Caprina

MVV – Vírus Maedi-Visna

NP - Nucleoproteína

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal

ORF – Open reading frames

PBS – Solução salina fosfatada

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEG - Polietilenoglicol

PR - Protease

R – Repeat

RNA – Ácido ribonucléico

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

RT – Transcriptase reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SU - Glicoproteína de superfície

TM – Glicoproteína transmembranar

TN – Tampão Tris/cloreto de sódio

TNE – Tampão TRIS/cloreto de sódio/EDTA

tRNA – Ácido ribonucléico transportador

U3 – Unique 3

U5 – Unique 5

WB – Western blot

1. INTRODUÇÃO

A artrite-encefalite caprina (CAE) foi descrita por Cork et al. (1974), nos USA, como uma encefalite em caprinos jovens e artrite crônica em animais adultos. O vírus da CAE (CAEV) foi isolado e identificado como retrovírus por Crawford et al. (1980), semelhante ao vírus Visna-Maedi previamente descrito na Islândia (THORMAR e HELGADOTTIR, 1965; GUDNADOTTIR e PALSSON, 1967). Esses vírus atualmente são classificados como CAEV e Visna/maedi (KING et al., 2012). Devido às semelhanças estruturais, biológicas, genéticas e a possibilidade de infecção cruzada entre ovinos e caprinos, CAE e Visna/maedi têm sido denominados Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) (RAMIREZ, 2013).

Maedi-visna e CAE fazem parte da Lista de Doenças da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), estão amplamente distribuídos em diversos países, principalmente os que apresentam ovino e caprinocultura mais tecnificadas, onde causam significativas perdas produtivas e prejuízos econômicos, sobretudo decorrentes da dificuldade de controle pela ausência de vacinas (REINA et al., 2013).

Nos rebanhos afetados o controle dos LVPR é feito pela segregação e/ou eliminação de animais infectados, com base em testes sorológicos e aquisição de animais negativos, preferencialmente de rebanhos livres. Os testes sorológicos recomendados para diagnóstico de LVPR são a imunodifusão em gel ágar (IDGA) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (DE ANDRÉS et al., 2005; OIE, 2015).

A IDGA, apesar de ser altamente específico, geralmente apresenta sensibilidade inferior ao ELISA, que apresenta outras vantagens, como a possibilidade de automação das leituras, quantificação dos anticorpos e teste de soro sanguíneo ou lácteo. Existem muitos ELISA utilizados para diagnóstico de LVPR, utilizando, como antígenos, proteínas nativas de LVPR ou proteínas recombinantes de LVPR expressas em *E. coli* e peptídeos sintéticos (HECKERT et al., 1992; RIMSTAD et al., 1994).

A produção de antígenos para diagnóstico de LVPR tem utilizado culturas celulares oriundas de diversos tipos de tecidos: membrana sinovial, plexo coroide, córnea entre outros (NARAYAN et al., 1980; ABREU et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; NASCIMENTO, 2012)

Apesar do considerável progresso no desenvolvimento das técnicas de cultivo de células, a manutenção e o crescimento das culturas são rotineiramente suplementadas com soro de origem animal, em especial o soro fetal bovino (SFB). Esta suplementação induz diversas variáveis nos protocolos de pesquisa, o que vem gerando preocupações e discussões

éticas e de segurança na comunidade científica (EIBL et al., 2008; VAN DER VALK et al., 2010).

As vantagens e disponibilidade dos meios livres de soro (MLS) são amplamente reconhecidas, pois fornecem uma forma mais definida e controle do ambiente de cultura, entretanto, o uso continuado de soro no meio de cultura celular parece basear-se essencialmente da prática histórica, em vez da necessidade científica (VAN DER VALK et al., 2004; BUTLER, 2007). Por outro lado, o emprego de culturas adequadas aos propósitos, bem como a compreensão das características do substrato celular e dos processos é fundamental para que os resultados e produtividade alcançados represente o perfil biológico do cultivo utilizado (HESSE e WAGNER, 2000; MORETTI et al., 2010; BERLEC e STRUKELJ, et al., 2013).

Recentemente foi estabelecido a linhagem celular CorFC a qual apresenta elevada viabilidade, taxa de multiplicação celular e permissividade a replicação de diversos vírus, inclusive LVPR, em níveis mínimos de SFB (NASCIMENTO, 2012).

Deste modo, espera-se que os principais benefícios sejam: uma maior velocidade no processo de produção e purificação de antígenos, segurança na redução do risco de contaminação, otimização dos protocolos, bem como redução dos custos, contribuindo assim para o bem-estar animal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver testes sorológicos (ELISA e IDGA) utilizando antígenos do vírus da CAE, obtidos a partir da linhagem CorFC cultivadas em meio com baixo teor de SFB.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o comportamento da linhagem CorFC infectadas pelo vírus da CAE, cultivadas em meio com baixo teor de SFB;

Padronizar um ELISA indireto (ELISAI) e uma IDGA para diagnóstico de LVPR em caprinos utilizando antígenos obtidos por um processo simples de preparação (clarificação, diálise e tratamento com triton X-100);

Avaliar o desempenho do ELISAI e IDGA com base na sensibilidade (S) e na especificidade (Sp) relativas dos testes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR)

3.1.1 Classificação

Os lentivírus pertencem a família Retroviridae infectam naturalmente um amplo número de mamíferos: seres humanos com Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV); primatas não humanos - Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV); equinos - Vírus da Imunodeficiência equina (EIAV); felinos - Vírus da Imunodeficiência felina (FIV), bovinos - Vírus da Imunodeficiência bovina (BIV), Vírus da doença Jembrana (JDV) e pequenos ruminantes que incluem o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e Maedi-Visna vírus (MVV) (KING et al., 2012).

O vírus da artrite-encefalite caprina foi descrito por Cork et al. (1974) como agente causal de encefalite em caprinos jovens e artrite crônica em animais adultos e identificado como um retrovírus por Crawford et al. (1980). Além de manifestações clínicas de artrite e encefalite, a infecção está associada à mastite (KENNEDY-STOSKOPF et al., 1985) e à pneumonia intersticial. Estas quatro formas de apresentação da doença também são observadas em ovinos infectados pelo vírus Maedi-Visna (NARAYAN et al., 1997; PEPIN et al., 1998).

Devido à possibilidade de infecção cruzada entre ovinos e caprinos, foram denominados lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) (RAMIREZ et al., 2013).

Os LVPR até a presente data estão classificados em cinco grupos filogenéticos (A-E) e que se subdividem em subtipos. Os grupos A e B são predominantes, o grupo A inclui 15 subtipos (A1-A15) e B apenas três (B1-B3) cujos protótipos são o MVV e CAEV respectivamente. (CASTRO et al., 1999b; BRAZ, 2013; RAMIREZ et al., 2013; REINA et al., 2013).

3.1.2 Estrutura

Os lentivírus são partículas esféricas, com diâmetro de 80 a 100 nm, possuem envelope externo fosfolipídico que contém glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranar (TM). As quais podem ser perdidas durante os processos de purificação viral por serem muito sensíveis.

As principais proteínas internas são a da matriz (MA), a do capsídeo (CA), que constitui o principal componente protéico do vírion; e a nucleoproteína (NP), associada ao RNA genômico. Encontra-se além desses componentes, proteínas de propriedades enzimáticas, como a transcriptase reversa (RT), protease (PR) e integrase (IN) (MURPHY et al., 1995; STONOS et al., 2014).

Seu genoma é formado por duas moléculas idênticas de RNA, com aproximadamente 10.000 pares de bases, dependente da transcriptase reversa. Contém nas extremidades 3' e 5' duas curtas sequências repeat (R) idênticas com mesma orientação, e uma sequência em cada extremidade, denominadas, unique 5 (U5) e U3, que exibem elementos promotores da transcrição do RNA viral. Após a retrotranscrição, o DNA proviral resultante apresenta duas regiões terminais não codificantes (long terminal repeat-LTR). Entre essas regiões extremas encontra-se os genes codantes para proteínas estruturais (gag e env) e enzimas virais (pol), além de pequenas open reading frames (ORF), adicionais, para proteínas reguladoras denominadas tat, rev e vif (CLEMENTS e PAYNE, 1994; RAMIREZ et al., 2013).

O gene gag codifica um precursor, que após clivagem proteolítica resulta nas proteínas MA, CA e NP; o pol codifica as proteínas de atividade enzimática (RT, PR, IN e dUTPase); o env codifica um precursor que é clivado por uma protease celular, resultando nas glicoproteínas do envelope (SU e TM); tat, rev e vif, codificam proteínas reguladoras da expressão viral, também denominadas Tat, Rev e Vif (SONIGO et al., 1985; DAVIS e CLEMENTS, 1989; SALTARELLI et al., 1990; HARMACHE et al., 1995; GAZIT et al., 1996; STONOS et al., 2014).

3.1.3 Replicação

A replicação dos LVPR consiste na ligação do vírus pelas glicoproteínas do envelope aos receptores da superfície celular, após a fusão com a membrana celular e destruição parcial do capsídeo ocorre a liberação do RNA viral no citoplasma que sob a ação da RT sintetiza uma cópia de DNA. Durante a síntese do DNA as sequências U3 e U5 são duplicadas e orientadas na mesma direção (U3-R-U5) para formar as LTR, que são utilizadas para integração do DNA viral no DNA genômico do hospedeiro, sob ação da IN, e formar o provírus (CASTRO et al., 1999; RAMIREZ et al., 2013).

A transcrição do DNA proviral em RNA genômico pela ação da enzima celular RNA polimerase II, acontece em um primeiro momento, evidenciado pela presença, especialmente no citoplasma, de pequenos mRNAs virais, responsáveis pela produção das proteínas de

regulação (Tat e Rev), e outra, durante a qual ocorre acentuada transcrição, resultante no surgimento de pequenos e de grandes mRNAs, com composição das proteínas estruturais (Gag e Env), enzimas virais (Pol) e a última proteína de regulação (Vif) (VIGNE et al., 1987; SARGAN et al., 1994; LARRUSKAIN e JUGO, 2013).

Os mRNAs codificantes para Env são traduzidos nos polirribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso e o produto fica aportado na membrana celular, enquanto que os RNA completos são traduzidos em precursores gag ou gag-pol, nos polirribossomos livres. Após a síntese dos componentes virais ocorre a montagem, fenômeno controlado pelo precursor gag, com encapsidação de duas moléculas de RNA genômico, tRNA primer e RT; estabelecimento proteolítico dos polipeptídeos precursores e o brotamento das partículas virais, que adquirem componentes lipídicos da membrana celular para formação do envelope viral (CLEMENTS e PAYNE, 1994; STONOS et al., 2014).

Os LVPR apresentam elevada frequência de mutações, que são acumuladas e favorecem o desenvolvimento desse grupo. O acúmulo de mutações leva a coexistência de subpopulações virais heterogêneas, provenientes de um mesmo genoma antecessor, conhecidas como quasispécies (PRESTON e DOUGHERTY, 1996; RAMIREZ et al., 2013).

3.1.4 Tropismo celular

Em relação às células permissíveis à replicação *in vivo* destacam-se as do sistema monocítico-fagocitário. O vírus infecta monócitos, os quais são permissíveis para a adsorção viral e integração do genoma, mas a infecção permanece encoberta até que a célula diferenciase em macrófagos. Esta maturação aumenta a expressão dos fatores de transcrição consequentemente, a replicação viral (NARAYAN et al., 1982; BRODIE et al., 1995). Contudo, já foram isolados vírus em outros tipos celulares como células fibroblásticas, epiteliais, endoteliais e do plexo coróide (GEORGSSON et al., 1989; ZINK et al., 1990; CARROZA et al., 2003; RAMIREZ et al., 2013).

Estudos têm utilizado uma variedade de cultivos celulares oriundos de diversos tipos de tecidos para isolamento e replicação dos LVPR *in vitro*, a exemplo: **Membrana Sinovial** – (NARAYAN et al., 1980; CRAWFORD e ADAMS, 1981; KNOWLES et al., 1994; DAVIES et al., 1997; ABREU et al., 1998; SIMARD et al., 2001; CHEEVERS et al., 2003; ARRUDA et al., 2011); **Fibroblastos Caprinos Imortalizados** – (TEIXEIRA et al., 1997; MSELLI-

LAKHAL et al., 2000); **Células musculares lisas** – (LEUROX et al., 1995; LECHAT et al., 2005); **Células do cumullus oophurus** – (CORTEZ ROMERO et al. (2006); **Células do Plexo Coroide** – (WINWARD et al., 1979; HOUWERS e NAUTA, 1989; CHEBLOUNE et al., 1996; FEVEREIRO et al., 1999; CELER et al., 2000; KRISTBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004; ELTHAIR et al., 2006); **Células Epiteliais Mamárias** – (ZANONI et al., 1994; LERONDELLE et al.,1999); **Células de Córnea** - (HECKERT et al., 1992; SIMARD et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008; NASCIMENTO, 2012).

3.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial dos LVPR é baseado primariamente na detecção de anticorpos antivirais o qual demonstra indiretamente a existência de infecção. No entanto, a pesquisa direta da infecção, pelo isolamento e identificação do agente não é utilizado rotineiramente por ser demorado e dispendioso. Alternativamente, tem-se utilizado a reação em cadeia de polimerase (PCR) (REINA, 2013).

Dentre os testes disponíveis: Imunodifusão em gel de agar (IDGA); ELISA; Imunoprecipitação; Radioimunoensaio (RIA); Western blot (WB) e Reação em cadeia da polimerase (PCR) quer seja direto ou indiretos, é necessário que se tenha um teste de alta sensibilidade e especificidade. A IDGA tem sido amplamente utilizada (KNOWLES et al., 1994; ABREU et al., 1998; ARRUDA et al., 2011). Contudo em virtude de sua maior sensibilidade e possibilidade de automação, vários ELISA têm sido desenvolvidos para pesquisa de anticorpos séricos, usando-se antígenos CAE, MVV, proteína recombinante ou peptídeos sintéticos (HECKERT et al., 1992, ZANONI et al., 1994; DE ANDRÉS et al., 2005; BRINKHOF et al., 2007; RAMIREZ et al., 2013)

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza o uso dos testes sorológicos IDGA e ELISA no diagnóstico de LVPR para o comércio internacional.

A IDGA apresenta baixo custo, exigindo poucos equipamentos, facilidade de execução e alta especificidade, geralmente apresenta sensibilidade inferior aos ELISA, que mostram outras vantagens, como a possibilidade de automação das leituras o que permite processar um número maior de amostras quando comparado com a IDGA, quantificação dos anticorpos e teste de soro sanguíneo ou lácteo. Entretanto a sensibilidade deste teste depende do tipo, processo e qualidade do antígeno utilizado (HERRMANN-HOESING, 2010; OIE, 2015).

Diversos métodos tem utilizado o cultivo de células para a produção e purificação de antígenos para diagnóstico de LVPR, que demandam excessos de manipulação, uso de cromatografia, filtração sob pressão, centrifugação em gradiente e/ou ultracentrifugação (ZANONI et al. 1994; CASTRO et al., 1999; MOREIRA et al., 2010; ALVES et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014).

3.2 Cultura Celular

3.2.1 Aplicações

A biotecnologia, que por definição consiste no uso de organismos, sistemas e processos biológicos para obtenção de produtos e serviços, data dos primórdios da civilização. Os trabalhos no campo do cultivo de células e de tecidos tiveram sua origem no final século XIX quando se começou a estudar com maior detalhe os órgãos e tecidos inseridos em vasos de vidro (UNCHERN, 1999; SCHEPER, 2000; BUTLER, 2007).

O cultivo de células firmou-se como um método relevante tanto para a pesquisa como para a biotecnologia. Os avanços das técnicas de cultura celular permitiram o estabelecimento de modelos mais simples do que os realizados com animais de experimentação. (FRESNEY, 2002; BERLEC e STRUKELJ, et al., 2013).

Tem sido de suma importância para o desenvolvimento e expansão nas áreas da medicina regenerativa, na produção de biofármacos e imunobiológicos, genética, oncologia, virologia entre outros (EKWALL et al., 1990; VINCI e PAREKH, 2003; BARRY, 2004; PEREZ e CURI, 2005; DUROCHER e BUTLER, 2009; LUCEY, 2009; MEYER, 2009; SUNLEY, 2010; AMORIN et al., 2013; SANDERS, 2013; FDA, 2015).

Estudos recentes demonstraram que o cultivo de células é utilizado em larga escala por indústrias farmacêuticas e companhias de biotecnologia na obtenção de produtos biológicos com alto grau de pureza, representando um mercado cujo crescimento anual está entre 10 e 20 % (BUTLER, 2007; ZHU, 2012; RADER, 2013).

Por outro lado o emprego de culturas adequadas aos propósitos, bem como a compreensão das características do substrato celular e dos processos são fundamentais para que os resultados e produtividade alcançados representem o perfil biológico do cultivo utilizado, possível otimização do protocolo, bem como redução dos custos (HESSE, 2000; FRESNEY, 2002; MORETTI et al., 2010).

3.2.2 Células em Cultivo

Os diferentes tipos de células podem ser identificados por suas características morfológicas em um organismo íntegro, entretanto em cultivo várias propriedades, incluindo sua forma e bioquímica podem ser afetadas devido às condições usadas para estabelecer e manter a cultura. Tais alterações refletem o caráter das células sobreviventes e a população resultante baseia-se no sucesso reprodutivo das células que melhor se adaptaram às condições de cultura (PAUL, 1975; NOVIKOFF e HOLTZAN, 1995; BURLESON, et al., 1992; WISE, 2004).

As células que crescem em cultivo, seja em suspensão ou aderentes, estão divididas em três classes: células primárias, células linhagem finita e células de linhagem contínua (BURLESON, et al., 1992; FRESNEY, 2006).

Células primárias são aquelas obtidas diretamente do órgão ou tecido, após a desagregação enzimática, ou mecânica. Esta cultura é constituída por uma população mista e retém algumas características do tecido de origem (FRESNEY, 2006).

A população derivada de passagens e dispersão subsequentes realizadas no cultivo primário são denominados cultivos secundários, estas mantêm o cariótipo do tecido de origem, entretanto não podem ser subcultivadas indefinidamente (WISE, 2004; FRESNEY, 2006; WHO, 2013).

Linhagens contínuas são substratos que derivam de tumores ou células transformadas obtidas mediante a transfecção com oncogenes, ou ainda pela transformação das células de um cultivo primário, que se sobrepõem ao restante da cultura resultado de inúmeras passagens, havendo uma mutação lenta de algumas células, tornando-se predominantes.

Estas células crescem em alta densidade, mesmo quando semeadas em baixas concentrações e possuem um potencial de cultivo indefinido, entretanto dependem dos mesmos requerimentos nutricionais das células anteriormente citadas. Comparadas às culturas primárias, experimentos empregando células de linhagens tendem a apresentar menor variação nos resultados obtidos, oferecendo maior reprodutibilidade e fidelidade dos dados (MORGAN e DARLING, 1995; VIRGINIO e TEIXEIRA, 2004; PEREZ e CURI, 2005; FRESNEY, 2006; MASTERS e STACEY, 2007).

3.2.3 Subcultura

Quando o cultivo atinge a fase estacionária, ocorre uma redução na taxa de crescimento celular, seja por esgotamento do meio e/ou uma inibição por confluência, assim as células devem ser subcultivadas antes de atingirem uma densidade que leve todo sistema a uma condição de degeneração (MORGAN e DARLING, 1995; MATHER e ROBERTS, 1998; GIBCO, 2015).

O emprego de enzimas proteolíticas é o método mais difundido para a dispersão celular e entre as mais utilizadas está a tripsina. No processo de tripsinização, o tempo para se obter uma suspensão celular depende de cada cultura e condição da monocamada, contudo deve-se ter cuidado com exposição excessiva das células a associação tripsina-versene (ATV) pois esta pode causar danos irreversíveis a estrutura celular (FRESHNEY, 2005).

A ação da tripsina e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é inibida pela presença de fatores anti-proteolíticos do SFB e pelos íons cálcio e magnésio presentes no meio de cultura respectivamente utilizados na realização de subculturas (RIZZO, 1977; MORGAN e DARLING, 1995; DOYLE e GRIFFITHS, 1998; VAN DER VALK et al., 2010)

3.2.4 Meios

O princípio básico para o crescimento e manutenção de células *in vitro*, é estabelecer um sistema onde fatores ambientais importantes como o suporte sobre o qual as estas crescem, temperatura, pH e o meio de cultivo irá determinar o desenvolvimento das células e o estabelecimento da cultura (FRESHNEY, 2005; BUTLER, 2007; GSTRAUNTHALER, 2010).

O meio para cultura celular é constituído por uma salina isotônica contendo os nutrientes essenciais para o metabolismo, crescimento e proliferação, sua composição tem papel determinante na dinâmica populacional consequentemente na produtividade e qualidade do produto, uma vez que deve fornecer as condições fisiológicas adequadas para o cultivo.

Os chamados meios basais possuem quatro grupos químicos fundamentais: vitaminas, aminoácidos, sais inorgânicos e carboidratos, estes constituintes podem ter origem e preparação de acordo com cada fabricante e em conformidade com diferentes especificações e níveis de pureza (MORGAN e DARLING, 1995; HARTUNG et al., 2002; BÜSCHER et al., 2009; ZHU, 2012)

Eagle (1955) descreveu o meio essencial mínimo (MEM), necessário para o cultivo de células de mamíferos aderentes ou em suspensão, inclui 12 aminoácidos, oito vitaminas, cinco espécies de íons, glicose e vermelho de fenol. Seguido por Ham em 1965, constituíram a base sobre a qual os meios de cultura foram estabelecidos com objetivo de atender as necessidades das culturas celulares existentes (PAUL, 1975; KRETZMER, 2002; FRESHNEY, 2005; MEYER, 2009).

Substratos celulares diferem quanto ao grau de adaptação para crescer em meios de cultura definidos, tais como meios livres de soro (MLS) visto que cada um tem suas próprias necessidades em matéria de suplementos, por isso o meio de cultura escolhido deve ser apto a sustentar o crescimento e sobrevivência do cultivo (MELLADO e CASTILHO, 2008; BRUNNER et al., 2010; WHO, 2013).

Existem diferentes formulações de MLS que podem ser testadas e adaptadas para novas culturas, exemplos de meios amplamente utilizados são o Dulbecco's Modified Eagle's Medium / Ham's Nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12) e o Roswell Park Memorial Institute (RPMI), entre outros demonstraram que o soro pode ser reduzido ou omitido (FRESHNEY, 2005; CHEN e CHEN, 2009; BRUNNER et al., 2010; HERNANDEZ e PIERA, 2010).

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens do MLS

Vantagens	Desvantagens
Desempenho mais consistente	Necessidade de maior grau de pureza de reagente
Processamento e purificação mais fácil	Um crescimento mais lento
Avaliação precisa de funções celulares	
Aumento da produtividade	
Melhor controle sobre a resposta fisiológica	
Detecção de mediadores celulares	

Tabela 2: Composição de três tipos de meios frequentemente utilizados em culturas de células

COMPONENTES	MEM (mg/l)	DMEM/F-12 (mg/l)	RPMI 1640 (mg/l)
Sais Inorgânicos			
CaCl ₂ - 2H ₂ O	264	264	-
Ca(NO ₃) ₂ - 4 H ₂ O	-	-	100
Fe(NO ₃) ₃ - 9H ₂ O	-	0.1	-
KCl	400	400	400
MgSO ₄ - 7H ₂ O	200	200	100
NaCl	6.800	6400	6.000
NaHCO ₃	2.200	3.700	2.000
NaH ₂ PO ₄ - 2H ₂ O	158	141	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	800
Aminoácidos			
L-arginina. HCl	126	84	-
L-asparagina	-	-	50
Ácido L-aspártico	-	-	20
L-cistina	24	48	50
Ácido glutâmico	-	-	20
L-glutamina	292	584	300
Glutaciona	-	-	1
Glicina	-	30	10
L-histidina . Hcl - H ₂ O	42	42	-
L-histidina	-	-	15
L-hidroxiprolina	-	-	20
L-isoleucina	52	105	50
L-leucina	53	105	50
L-lisina - HCl	73	146	40
L-metionina	15	30	15
L-fenilalanina	33	66	15
L-prolina	-	-	20

COMPONENTES	MEM (mg/l)	DMEM (mg/l)	RPMI 1640 (mg/l)
L-serina	-	42	30
L-treonina	48	95	20
L-triptófano	10	16	5
L-tirosina	36	72	20
L-valina	-	94	20
Vitaminas			
Biotina	-	-	0.2
D-Ca pantotenato	1	4	0.3
Cloreto de colina	1	4	3
Ácido fólico	1	4	1
i-inositol	2	12.6	35
Nicotinamida	4	4	1
Ácido para-aminobenzóico	-	-	1
Piridoxal - HCl	1	4	1
Riboflavina	0.1	0.4	0.2
Tiamina - HCl	1	4	1
Vitamina B ₁₂	-	-	0.005
Outros			
D - Glicose	1.000	4.500	2.000
Vermelho Fenol	10	15	5
Piruvato sódico	-	110	-

3.2.5 Suplementos

Suplementos são frequentemente adicionados ao meio de cultivo, o mais comum é soro de origem animal adicionado numa proporção de 5 - 15% (v / v). O soro mais utilizado é o de origem bovina, normalmente na forma de soro fetal bovino (SFB), pois de modo geral quanto mais jovem o animal, maior é o poder de promoção de crescimento celular (PAZOS, et al., 2004; ISAAC et al., 2011; HASHIM et al., 2012).

Utilizado a mais de cinco décadas o SFB é uma mistura complexa de diferentes fatores, o qual ainda não foi devidamente caracterizado, contendo um grande número de componentes, como proteínas, vitaminas, minerais, lipídeos, hormônios, fatores de desintoxicação necessários para manter o pH, inibidores de proteases como a α -antitripsina entre outros, sendo um suplemento para a fixação, crescimento e proliferação eficaz com a maioria dos tipos de células humanos e animais (BRUNNER et al., 2010; RAUCH et al., 2011; HASHIM et al., 2012; GSTRAUNTHALER, 2013).

O SFB é um subproduto da indústria de cortes de carne, sua utilização em cultura celular também tem desvantagens como:

- 1) Preocupações éticas e questões de bem-estar animal - o SFB é colhido de fetos por meio de punção cardíaca, sem anestesia;
- 2) Científicos – variações na composição do soro de lote para lote, compromete as culturas e os resultados;
- 3) Biossegurança - o soro pode ser uma fonte potencial de contaminação, tais como vírus ou príons, fungos, bactérias, micoplasmas;
- 4) Econômico - uma vez que o valor varia conforme a origem do produto e taxa cambial;
- 5) Qualidade do produto - dificuldade na obtenção da proteína de interesse devido ao alto teor de proteínas heterólogas (ROMIJN, 1988; VAN DER VALK et al., 2004; EVEN et al., 2006; FALKNER et al., 2006; KEENAN, 2006; GRILLBERGER, et al., 2009; BRUNNER et al., 2010; COSTA et al., 2010; RAUCH et al., 2011).

Segundo Gstraunthaler (2013) estima-se que aproximadamente 500.000 litros de SFB são vendidos por ano, o que significa que mais de 1.000.000 de fetos bovinos tem que ser colhidos para atender a crescente demanda.

Em 2013, a GE Healthcare proprietária do PAA Laboratories localizado em Linz na Áustria divulgou comunicado urgente de que alguns lotes de SFB produzidos entre 2008 até

2013 não estão em conformidade, por conter Albumina de Soro Bovino (BSA), água e/ou aditivos promotores de crescimento celular (FDA, 2015).

Fatos como este levam a reflexões sobre o uso do SFB em cultivos celulares, bem como a necessidade de buscar alternativas para sua substituição ou redução, que aliado aos princípios estabelecidos nas Boas Práticas de Cultivo Celular (BPCC) e das Boas Práticas Laboratoriais (BPL) pressupõe uma garantia de qualidade a muito necessária (BALLS, et al., 2006; UNGER, 2008; GSTRAUNTHALER et al., 2014).

Tabela 3: Composição do Soro Fetal Bovino

COMPONENTES	MÉDIA	GAMA
Endotoxinas (ng / ml)	0.35	0.01 - 10.0
Glicose (mg / ml)	1.25	0.85 - 1.81
Proteínas (mg / ml)	38	32 - 70
Albumina (mg / ml)	23	20 - 36
Hemoglobina (ug / ml)	113	24 - 181
Bilirrubina total (ng / ml)	4	3 - 11
Bilirrubina direta (ug / ml)	2	0 - 5
Ureia (ug / ml)	160	140 - 200
Urato (ug / ml)	29	13 - 41
Creatinina (ug / ml)	31	16 - 43
Insulina (mU / ml)	10	6 - 14
Cortisol (ng / ml)	0.5	0.1 - 23
Horm do crescimento (ng / ml)	39.0	18.7 - 51.6
HPT (ng / ml)	1.72	0.085 - 6.18
T3 (ng / ml)	1.2	0.56 - 2.23
T4 (ng / ml)	0.12	0.08 - 0.16
TSH (ng / ml)	1.22	0.2 - 4.5
FSH (pg / ml)	95	20 - 338
Testosterona (pg / ml)	400	210 - 990

COMPONENTES	MÉDIA	GAMA
Progesterona, P4 (pg / ml)	80	3 - 360
LTH (pg / ml)	176	20 - 500
LH (pg / ml)	8	1,2 - 18
Prostaglandina Ei (ng / ml)	5.9	0.5 - 30.5
Prostaglandina F (ng / ml)	12.3	3.8 - 42.0
Vitamina A (ng / ml)	90	10 - 350
Vitamina E (ng / ml)	1.1	1 - 4.2
Colesterol (ug / ml)	310	120 - 630
LDH (mU / ml)	864	260 - 1,215
Fosfatase Alcalina (mU / ml)	255	110 - 352
ASAT (mU / ml)	130	20 - 200
Sódio (μ eq / ml)	137	125 - 143
Potássio (μ eq / ml)	11.2	10.0 - 14.0
Cálcio (μ eq / ml)	6.75	6.30 - 7.15
Cloreto (μ eq / ml)	103	98 - 108
Fosfato (ug / ml)	98	43 - 114
Selênio (ug / ml)	0.026	0.014 - 0.038
pH	7.40	7.20 - 7.60

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. 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, 1998.

ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E.; DEMARTINE, J. C., VERWOERD, D. W.; HOWERS, D. J., WAGHELA, S., GORHAM, J. R., HYLLSETH, B.; DAWSON, M.; TRIGO, F. J.; MCGUIRE, T. C.; Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Record**, v.115, n.19, p.493-495, 1984.

AMORIN, B.; VALIM, V. S.; LEMOS, N. E.; JUNIOR, L. M.; SILLA, L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista do Hospital das Clínicas**. Porto Alegre, v.32, p.71-81, 2013

ANDREASSI, L. History of keratinocyte cultivation. **Clinical report**. Italy, v.18, n. 1, p. 52-54, 1992.

ARAÚJO, S.A.C.; PINHEIRO, R.R.; DANTAS, T.V.M.; ANDRIOLI, A.; LIMA, F.E.S.; DIAS, R.P.; CAMPELLO, C.C.; COSTA, E.C.; RICARTE, A.R.F.; MELO, V.S.P.; ROLIM, B.N.; SILVA, J.B.A. TEIXEIRA, M.F.S. Inibição dos lentivírus de pequenos ruminantes por drogas antivirais. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.2, p.225-232, abr./jun., 2010

ARRUDA, E. T.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. A.; CAMPOS, A. C.; CASTRO, R. S. Avaliação de uma microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**., Goiânia, v.12, n.3, p. 560-565, jul./set. 2011.

ASSIS, M. F.; SANTOS E. C. O.; JESUS I. M.; PINTO W. V. M.; MEDEIROS R. L. F.; SILVA D. F. L. Uso da cultura de células em testes diagnósticos laboratoriais em Medicina e biologia. **Caderno Saúde coletiva**. Rio de Janeiro, v. 15, p. 425 – 432, 2002.

BALLS, M.; COECKE, S.; BOWE, G. The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP). Proceedings of the 5th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Berlin, Germany, 2005. **ALTEX** v.23, Spec. Issue, p. 270-273, 2006.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v.36, p.568-574, 2004.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **j ind microbiology biotechnology**, v. 40, p. 257–264, 2013.

BOEHM, J. S; HAHN, W.C. Immortalized cells as experimental models to study cancer. **Cytotechnology**. 2004; 45(1-2):47-59.

BRINKHOF, J. e VAN MAANEN, C. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 1210–1214, 2007.

BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but no entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v.146, p.250-263, 1995.

BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G., Serum free cell culture: the serum-free media interactive online database. **ALTEX**, v. 27, p. 53-62, 2010.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology: A laboratory manual**. London: Academic Press, 1992. p.8-15.

BÜSCHER, D.; DELGADO, M.; GONZALEZ-REY, E. Uses of mesenchymal stem cells. **U.S. Patent Application** 13/057,467, 2009.

BUTLER, M. **Cell culture and upstream processing. In: Technology (ESACT) and Protein Expression in Animal Cells (PEACe).** New York: Taylor & Francis Group, 2007. 202p

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** Rio de Janeiro, v. 21. n.3. p.87-97. 2001.

CARROZA, M. L.; MAZZEI, M.; BANDECCHI, P. et al. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. **Journal of Virological Methods**, v. 107, p. 121-127, 2003.

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M. G. A labelled avidinbiotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. **Veterinary Research Communications**, v.23, p.515-522, 1999a.

CASTRO, R. S., LEITE, R. C.; RESENDE, M. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of brasilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. **J. General Virology**, v. 80, p. 1583-1589, 1999b.

CASTRO, R. S. e MODOLO, J. R. Lentiviruses de pequenos ruminantes. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia** 1ª Edição. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 67, p. 730-735.

CELER Jr, V.; CELER, V.; NEJEDLA, E. 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 of Veterinary Medicine – Series B**, v. 47, p. 203-215, 2000.

CELER Jr, V.; CELER, V. Detection of antibodies to ovine lentivirus using recombinant capsid and transmembrane proteins. **Journal of Veterinary Medicine – Series B**, v. 48, p. 89-95, 2001.

CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D. et al. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell culture. **Virology**, v. 222, p. 21-30, 1996.

CHEEVERS, W.P.; SNEKVIK, K.R.; TRUJILLO, J.D. et al Prime-boost vaccination with plasmid DNA encoding caprine-arthritis encephalitis lentivirus env and viral SU suppresses challenge virus and development of arthritis. **Virology**, v. 306, p. 116–125, 2003.

CHEN T.; CHEN K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free Culture. **International Journal of Biology**, v.1, p 41-47, 2009.

CLAWSON, M. L., REDDEN, R., SCHULLER, G., HEATON, M. P., WORKMAN, A., AND LEYMASTER, K. A. Genetic subgroup of small ruminant lentiviruses that infects sheep homozygous for TMEM154 frameshift deletion mutation A4Δ53. **Veterinary**, v.46:22, p. 1-6, 2015.

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

COFFIN, J. M. **Retroviridae: the virus their of replication**. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CNANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3 ed. Fields Virology, Philadelphia, Lippincott-Raven, p. 1767-1847, 1996.

CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B. et al Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **Journal of Infectious Disease.**, v.129, p.134-141, 1974.

CORTEZ-ROMERO, C.; FIENI, F.; ROUX, P. et al. Detection of ovine lentivirus in the cumulus cells, but not in the oocytes or follicular fluid, of naturally infected sheep. **Theriogenology**, v. 66, p. 1131-1139, 2006.

COSTA A. R.; RODRIGUES M. E.; HENRIQUES M.; AZEREDO J.; OLIVEIRA R. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p.127-138, 2010.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v.178, p.713-719, 1981.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v.207, p.997-999, 1980.

CRUZ, A. S.; FIGUEIREDO, C. A.; BARBOSA, M. L.; SALLES-GOMES, L.F. Linhagem celular continua de rim de coelho - Características e substrato para replicação de vírus. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.26, n. 6 , p. 392-399, 1992.

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, 1997.

DAVIS, J.L.; CLEMENTS, J.E. Characterization of a cDNA clone encoding the visna virus transactivating protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.86, p.414-418, 1989.

DE ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTCINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses **Veterinary Microbiology**. v. 107, p. 49-62, 2005.

DILS, R. R. Explants and disaggregated tissue preparations as model systems in nutritional research: advantages and pitfalls. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.43, p.133-140, 1984.

DOYLE, A.; GRIFFITHS J. B.; **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology**, Oxford: John Wiley & Sons Ltd, 1998. 354p.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 700-707, 2009.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p. 501-504, 1955.

EIBL, D.; EIBL, R.; PÖRTNER, R. **Mammalian Cell Culture Technology: An Emerging Field**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. 363p.

ELTAHIR, Y. M.; DOVAS, C. I.; PAPANASTASSOPOULOU, M. et al. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. **Journal of Virological Methods**, v. 135, p. 240-46, 2006.

EKWALL, B.; SILANO, V.; PAGANUZZI-STAMMATI, A.; ZUCCO, F. **Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures**, Published by John Wiley & Sons Ltd, 1990. 208p.

EVEN M. S.; SANDUSKY C. B.; BARNARD N. D. Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. **TRENDS in Biotechnology**, v.24. p.105-108, 2006.

FDA (2013) US Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfRes/res.cfm?ID> Acessado em 08 de setembro de 2015.

FALKNER, A. B. E.; APPL, B. H.; EDER, B. C.; LOSERT, A.U.M.; SCHÖZ, B. H.; PFALLER, B. W. Serum free cell culture: The free access online database **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 395–400, 2006.

FELL, H. B. The George Bidder lectures - Tissue Culture and its contribution to Biology and Medicine. **The Journal of Experimental Biology**. v. 55(1), p.1-12, 1971.

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.

FRESHNEY, R. I. Cell Line provenance. **Cytotechnology**. v.39, p. 55-67, 2002.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 15. ed., New York: John Wiley & Sons, Inc. 2005. 580p.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Cells for Tissue Engineering**, edited by Gordana Vunjak-Novakovic and Copyright John Wiley & Sons, Inc., 2006, 404p.

GAZIT, A.; MASHIAH, P.; KALINSKI, H.; GAST, A.; ROSIN-ABERSFELD, R.; TRONICK, S.R.; YANIV, A. Two species of Rev proteins, with distinct N termini, are expressed by Caprine Arthritis-Encephalitis virus. **J. Virol.**, v.70, p.2674-2677, 1996.

GEORGSSON, G.; HOUWERS, J.D.; PALSSON, P.A.; PERTURSSON, G. Expression of viral antigens in the central nervous system of visna-infected sheep: an immunohistochemical study on experimental visna induced by virus strains of increased neurovirulence. **Acta Neuropathology**, v.77, p.299-306, 1989.

GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. Annual New York Academic. **Science**, v. 724, p. 22-42, 1994.

GRILLBERGER, L.; KREIL, T. R.; NASR, S.; REITER, M. Emerging trends in plasma-free manufacturing of recombinant protein therapeutics expressed in mammalian cells. **Biotechnology Journal**, v.4, p.186-201, 2009.

GSTRAUNTHALER, G. Innovative technologies, concepts and approaches Good Cell Culture Practice. **Altex** 27, Special Issue, p. 141-146, 2010.

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture Media. **Cytotechnology**, v. 65, p.791–793, 2013.

GSTRAUNTHALER, G.; LINDL, T.; VAN DER VALK, J. A Severe Case of Fraudulent Blending of Fetal Bovine Serum Strengthens the Case for Serum-free Cell and Tissue Culture Applications. **Atla**, v.42, p. 207–209, 2014.

HARMACHE, A.; BOUYAC, M.; AUDOLY, G.; HIEBLOT, C.; PEVERI, P.; VIGNE, R.; SUZAN, M. 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. **J. Virol.**, v.69, p.3247-3257, 1995.

HARTUNG, T.; BALLS, M.; BARDOUILLE, C.; BLANCK, O.; COECKE, S.; GSTRAUNTHALER, G.; LEWIS, D. Good Cell Culture Practice **Atla** **30**, p. 407-414, 2002.

HASHIM; Y. Z. H.; MEL, M.; SALLEH, H. M.; NOR, Y. A.; OTHMAN, S.; RAZAK, W. H. W. A. Serum In Mammalian Cell Culture: Weighing The Challenges of Bioprocessing, Ethics and Animal Welfare Advances in Natural and Applied Sciences, v.6(5), p. 596-600, 2012.

HECKERT, R.A.; McNAB, W.B.; RICHARDSON, S.M.; BISCOE, M.R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.56, p.237-241, 1992.

HELGASON C. D.; MILLER C. L. **Methods in Molecular Biology.: Basic Cell Culture Protocols**. Totowa: Humana Press Inc. 3. ed. v. 290, 1998.

HERNANDEZ, J. C.; PIERA, C. M. Ares Trading S.A. **Serum-free cell culture medium for mammalian cells**. US 7,709,229 B2, 04 Mai. 2010.

HESSE F.; WAGNER, R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. **Trends in Biotechnology**. v.18(4), p.173-80, 2000.

HÖTZEL, I.; BASTOS, S. E.; RAVAZZOLO, A. P.; MOOJEN, V. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of the Medicine Biology Research**, v.26, p.1175-1179, 1993.

HOUWERS, D. J. e NAUTA, I. M. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 19, p. 127-139, 1989.

ISAAC, C.; MATTOS, C. N.; RÊGO, F. M. P.; CARDIM, L. N.; ALTRAN, S. C.; PAGGIARO, A. O.; CARNEIRO, R. M.; FERREIRA, M. C. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.26, n.3, p.379-384, 2011.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. **Lentiviroses**. In: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. *Fields Virology*, 3^a Ed. New York: Raven Press, 1996. p.1977-1996.

KEENAN, J.; PEARSON, D.; CLYNES, M. The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. **Cytotechnology**. v. 50(1-3), p. 49-56, 2006.

KENNEDY-STOSKOPF, S.; NARAYAN, O.; STRANDBERG, J.D. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal Comparative Pathology**, v.95, p.609-617, 1985.

KIRKLAND, P.D.; BATTY, E.M. Caprine arthritis-encephalitis virus: An efficient method for the large scale production of serological antigens. **J. Virol. Methods**, v.16, p.323–326, 1987.

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

KNOWLES, D.P.; EVERMANN, J.F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H. M.; CHEEVERS, W.P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.243-245, 1994.

KRETZMER, G. Industrial processes with animal cells. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.59, p. 135-142, 2002.

KRISTBJÖRNSDÓTTIR, H. B.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; SVANSSON, V. et al. The vif gene of maedi-visna virus is essential for infectivity in vivo and in vitro. **Virology**, v. 318, p. 350-359, 2004.

LARRUSKAIN A.; JUGO, B. M. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. **Viruses**, 5(8): 2043-61, 2013.

LECHAT, E.; MILHAU, N.; BRUN, P. et al. Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p.257-263, 2005.

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

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I. et al. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. **Archives of Virology**, v.140, p.1-11, 1995.

MASTERS, J. R e STACEY, G. N. Changing medium and passaging cell lines, 2007

MATHER J. P.; ROBERTS P. E. **Introduction to cell and tissue culture: theory and technique**. London: Plenum Press, 1998. 314p.

MELLADO, M. C. M.; CASTILHO, L. R. Proteínas recombinantes terapêuticas. In: Moraes, A. M.; Augusto, E. F. P.; Castilho, L. R. **Tecnologia de cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1ª Edição. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 16, p. 384-402.

MEYER, U. **The History of Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Perspective**. London: Hardcover, 2009. 339p.

MINUTH, W.W.; SITTINGER, M.; KLOTH, S. Tissue engineering generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. **Cell Tissue Research**, v.1, p.291, 1998.

MORETTI, P.; BEHR, L.; WALTER, J. G. Characterization and improvement of cell line performance *via* flow cytometry and cell sorting. **Eng. Life Sci.**, v. 10, n. 2, p. 130–138, 2010.

MORGAN, S. J.; DARLING, D. C. **Cultivo de células animais**. Zaragoza: Acribia, 1995. 160p

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.

NASCIMENTO, C. B.; PINHEIRO R. R.; ALVES, F. S. *et al.* Ferramentas diagnósticas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto Diagnostic tools of small ruminant lentiviruses: standardization of indirect ELISA. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p. 9-15, 2014.

NASCIMENTO, S. A. Descrição de uma linhagem de células de córnea fetal caprina (CorFC) naturalmente imortalizada: cultivo em meios com baixo teor de soro fetal bovino e uso para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) / 50 f. : Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) UFRPE – DMV Recife, 2012.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virology**, v.70, p.1617-1639, 1989.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **The Journal of General Virology**, v 50, p.69-79, 1980.

NARAYAN, O.; WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E et al. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **Journal of general Virology**, v. 59, p. 345-356, 1982.

NARAYAN, O.; JOAG, S. V.; CHEBLOUNE, Y.; ZINK, M. C.; CLEMENTS, J. E. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. **Viral Pathogenesis**. Philadelphia: N. Nathanson. Lippincott-Raven, p.657-668, 1997.

NOVIKOFF, A. B.; HOLTZAN, E. **Células e estruturas celulares**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1995. p. 412-420

OLIVEIRA, M.M.M.; MELO, M.A.; ANDRADE, P.P.; GOMES, S.M.; CAMPOS, A.C.; NASCIMENTO, S.A.; CASTRO, R.S. Western blot para o diagnóstico das infecções pelos

lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.3, p.263-270, 2008.

OIE – World Organization of Animal Health. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04_CAE_MV.pdf>. Acessado em 06 de outubro de 2015.

PAUL, J. **Cell and tissue culture**. London: Churchill Livingstone, 1975. 484p.

PAZOS, P.; BOVERI, M.; GENNARI, A.; CASADO, J.; FERNANDEZ, F.; PRIETO, P. Culturing Cells Without Serum: Lessons Learnt Using Molecules of Plant Origin. **ALTEX**, v. 21, p. 67-72, 2004.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. P.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infections in sheep: a review. **Veterinary Research**, v. 29, p. 341-367, 1998.

PINHEIRO R.R.; GOUVEIA A.M.G.; YORINORI E.H.; ANDRIOLI A. Comparação de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de imunodifusão em gel de Agar. **Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, 42:453-458, 2005.

PRESTON, B.; DOUGHERTY, J.P. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends Microbiol.**, v.4, p.16-21, 1996.

RADER, R. A. FDA Biopharmaceutical Product Approvals and Trends in 2012. **BioProcess International**, v. 11, n. 3, p. 18-27, 2013.

RAMÍREZ, H.; REINA, R.; AMORENA, B. *et al.* Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. **Viruses** v. 5, p. 1175-1207, 2013.

RAMIREZ, H., ROMAN, B.S., GLARIA, I., REINA, R., HERNANDEZ, M.M., DE ANDRES, X., CRESPO, H., HICHOU, B., CIANCA, S., GONI, C., GRANDAS, A., GARCIA-PASTOR, L., VIJIL, L.E., QUINTIN, F., GRILLO, M.J., DE ANDRES, D., AMORENA, B. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. **Theriogenology**, v. 72, p. 1085–1096, 2009.

RAUCH, C., FEIFEL, E., AMANN, E-M., SPÖTL, H.P., SCHEN -NACH, H., PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: Human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. **ALTEX**. v. 28, p. 305–316, 2011.

REINA, R.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Immunization against Small Ruminant Lentiviruses. **Viruses**, v.5, p. 1948-1963, 2013.

RIZZO, E. Effect of pH, temperature and time of stirring on solubility of trypsin used in cell cultures. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 8 n. 3, p. 94-97, 1977.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H. **Técnicas básicas de cultura celular**. São Paulo, Instituto Butantan - Instituto Adolfo Lutz, 1983. 134p.

ROMIJN H, J. Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. **Biology of the Cell**, v. 63, p. 263-268, 1988.

SALTARELLI, M.; QUÉRAT, G.; KONINGS, D.A.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J.E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV wich generate infectious virus. **Virology**, v.179, p.347-364, 1990.

SANDERS, B. P.; EDO-MATAS, D.; CUSTERS, J. H. H. V.; KOLDIJK, M. H.; KLAREN, V.; TURK, M.; LUITJENS, A.; BAKKER, W. A. M.; UYTDEHAAG, F.; GOUDSMIT, J.; LEWIS, J. A.; SCHUITEMAKER, H. PER.C6® cells as a serum-free suspension cell platform for the production of high titer poliovirus: A potential low cost of goods option for world supply of inactivated poliovirus vaccine. **Vaccine**, v.31, p.850- 856, 2013.

SARGAN, D.R.; ROY, D.J.; DALZIEL, R.G.; WATT, N.J.; MCCONNELL, I. A temporal study of RNAs produced in maedi-visna virus infection of choroid plexus cells. **Vet. Microbiol.**, v.39, p.369-378, 1994.

SCHEPER T. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, vol. 69 Springer-Verlag, 2000. 277p

SIMARD, C. L.; KIBENGE, M. T.; SINGH, P. et al. Simple and Rapid Method for Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 352 – 356, 2001.

SONIGO, P.; ALIZON, M.; STASKUS, K.; KLATZMANN, D.; COLE, S.; DANOS, O.; RETZEL, E.; TIOLLAIS, P.; HAASE, P.; WAIN-HOBSON, S. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. **Cell**, v.42, p.369-382, 1985.

STONOS, N.; WOOTTON, S. K.; KARROW, N. Immunogenetics of Small Ruminant Lentiviral Infections. **Viruses**, v. 6, p. 3311-3333, 2014.

SUNLEY, K.; BUTLER, M. Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth arrest. **Biotechnology Advances.**, v.28, p. 385–394, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 5.ed., Porto Alegre: ArtMed, 2000. 827p.

TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSELILAKAHL, L.; CHETTAB, A., CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal Veterinary Research**, v. 58, p. 579 - 584, 1997.

THORMA, H. Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. **AIDS Reviews**, v.7, p.233–245, 2005.

THORMAR H. e HELGADOTTIR H.. A comparison of visna and maedi viruses. II. Serological relationships. **Res. Vet. Sci.** 6:456-465, 1965.

UNGER, C.; SKOTTMAN, H.; BLOMBERG, P.; DILBER, M.; HOVATTA, O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. **Human Molecular Genetics** v.15, p.48-53, 2008.

VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R.; FISCHER, R.; GRUBER, F.; GSTRAUNTHALER, G.; HELLEBREKERS, L.; HYLLNER, J.; JONKER, F.H.; PRIETO, P.; THALEN, M.; BAUMANS, V. The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in Vitro**, v.18, n.1, p.1-12, 2004.

VAN DER VALK, J. V. D.; BRUNNER, D.; DE SMET, K.; SVENNINGSSEN, Å. F.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L.E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M.L.; GSTRAUNTHALER, G.; Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p.1053-1063, 2010.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 301-307, 2001.

VIGNE, R.; BARBAN, V.; QUÉRAT, G., MAZARIN, V.; GOURDOU, I. Transcription of visna virus during its lytic cycle: evidence for a sequential early and late gene expression. **Virology**, v.161, p.218-227, 1987.

VINCI, V. A.; PAREKH, S. R. **Handbook of industrial cell culture: mammalian, microbial, and plant cells**. Humana Press Inc 2003. 547p.

VIRGINIO C. G.; TEIXEIRA M. F. S. Uso de células de linhagem tífef para cultivo e produção de lentivírus ovino. **Ciência Animal**, v.14, n.2, p.69-75, 2004.

WASLEY, G. D.; MAY, J. W. **Animal cell culture methods**. Oxford: Blackwell scientific publication, 1970. 194p.

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

WISE, C. *Methods in Molecular Biology*, vol. 188: **Epithelial Cell Culture Protocols** Humana Press Inc., 2004. 388p

WITKOWSKI, J. A. Alexis carrel and the mysticism of tissue culture **Medical History**, v.23, p.179-296, 1979.

WHITE, P. R. **The cultivation of animal and plant cells**. New York, The Ronald press company, 1954. 239p

WHO World Health Organization. Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologics. **Technical Report Series**, n. 978, p.19- 56, 2013.

ZANONI, R.G.; VOGT, H.R.; POHL, B.; BÖTTCHER, J.; BOMMELI, W.; PETERHANS, E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. **Zentralblattfür Veterinärmededezin**, v. 41, p. 662-669. 1994.

ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; MYERS, J.D. Pathogenesis of Caprine Arthritis-Encephalitis virus: cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. **J. Pathology.**, v.136, p. 843-854, 1990.

ZHU, J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1158–1170, 2012.

5. EXPERIMENTO I

Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células de córnea de feto caprino (CorFC) cultivadas em meios suplementados com baixo teor de soro fetal bovino.

1 Avaliação de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina obtidos a partir de células
2 de córnea de feto caprino (CorFC) cultivadas em meios suplementados com baixo teor
3 de soro fetal bovino.

7 **Resumo**

8 Objetivou-se com este trabalho avaliar pela técnica de imunodifusão em gel de
9 ágar (IDGA), antígenos (Ag) do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) produzidos
10 em células de córnea de feto caprino (CorFC) cultivadas em MEM, DMEM/F12 e
11 RPMI 1640, suplementados com 0,1% de soro fetal bovino. Das 163 amostras de soros
12 testados (28 positivas e 135 negativas), 28 (17,17%) apresentaram resultados positivos
13 para o Ag MEM e Ag DMEM/12 e 29 (17,79%) para o Ag RPMI 1640. Comparando-se
14 os resultados obtidos com os Ag foi observada concordância ajustada de kappa quase
15 perfeita: MEM x DMEM/F12 ($kappa = 1,00$), MEM x RPMI 1640 e DMEM/F12 x
16 RPMI 1640 ($kappa = 0,98$). O antígeno Ag RPMI 1640, que apresentou melhor
17 qualidade das linhas de precipitação na IDGA e melhor rendimento (menor quantidade
18 de meio de cultura e SFB/mL de antígeno), foi avaliado comparativamente com um
19 antígeno comercial (Kit para diagnóstico de CAE – IDGA; Unika biotech, Recife). O
20 teste dos 797 soros com o Ag comercial apresentou 216 positivos e 581 negativos; com
21 o Ag RPMI 1640 foram observados 225 resultados positivos e 572 negativos,
22 correspondendo a sensibilidade (Se) e especificidade (Es) relativas de 100% e 98,45%,
23 respectivamente. De forma global, houve uma concordância ajustada ($kappa = 0,97$)
24 quase perfeita entre os resultados com Ag RPMI 1640 e Ag comercial. Dependendo do
25 tipo de célula e meio utilizado pode-se produzir antígenos de LVPR com baixo teor de
26 SFB, que corrobora com o bem estar animal, representa redução de custos com insumos
27 e nos processos de purificação de proteínas.

28 Palavras-chave: RPMI 1640, CAEV, IDGA, SFB

33 **Abstract**

34 The objective of this study was to evaluate the immunodiffusion agar gel
35 (AGID), antigens (Ag) of the virus caprine arthritis encephalitis (CAEV) produced in
36 goat fetus corneal cells (CorFC) grown in MEM, DMEM / F12 and RPMI 1640,
37 supplemented with 0.1% fetal bovine serum. Of the 163 samples tested sera (28 positive
38 and 135 negative), 28 (17.17%) were positive for Ag Ag MEM and DMEM / 12 and 29
39 (17.79%) for Ag RPMI 1640. Comparing, the results obtained with Ag was observed
40 almost perfect agreement adjusted kappa: x MEM DMEM / F12 (kappa = 1.00) x MEM
41 RPMI 1640 and DMEM / F12 x RPMI 1640 (kappa = 0.98). The Ag RPMI 1640
42 antigen, which showed better quality of precipitation lines in AGID best performance
43 (lowest amount of culture medium and FCS / mL of antigen) was evaluated
44 comparatively with a commercial antigen (Kit for diagnosis of CAE - AGID; unika
45 biotech, Recife). The test of 797 sera with commercial Ag showed 216 positive and 581
46 negative; RPMI 1640 with Ag were observed 225 positive and 572 negative,
47 corresponding to sensitivity (Se) and specificity (Es) for 100% and 98.45%,
48 respectively. Globally, there was an adjusted agreement (kappa = 0.97) almost perfect
49 between the results with Ag RPMI 1640 and commercial Ag. Depending on the cell
50 type and medium used can be produced LVPR antigens with low SFB content, which
51 agrees with the animal welfare is reducing input costs and protein purification
52 processes.

53 **Keywords:** RPMI 1640, CAEV, AGID, SFB

54

55 **Introdução**

56 As lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR), Artrite-Encefalite Caprina
57 (CAE) e Maedi-Visna (MV) dos ovinos, são enfermidades causadas pelos vírus da
58 Artrite-encefalite caprina (CAEV) e Visna/maedi (King *et al.*, 2012), que infectam
59 indistintamente caprinos e ovinos (Castro e Modolo, 2016). Estão amplamente
60 distribuídas principalmente nos países que apresentam a ovino e caprinocultura mais
61 tecnificadas, onde causam significativas perdas produtivas e prejuízos econômicos,
62 sobretudo decorrentes da dificuldade de controle pela ausência de vacinas (Reina,
63 2013).

64 Nos rebanhos afetados, o controle das LVPR é feito pela segregação e/ou
65 eliminação de animais infectados, identificados com base em testes sorológicos, e
66 reposição com animais negativos, preferencialmente de rebanhos livres. Os testes
67 sorológicos recomendados para diagnóstico das LVPR são a imunodifusão em gel de
68 ágar (IDGA) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (De Andrés *et al.*, 2005; OIE,
69 2015).

70 A produção de antígenos em cultivo celular, para uso na IDGA e ELISA no
71 diagnóstico das LVPR, tem sido realizada com células de Membrana Sinovial, Células
72 do Plexo Coroide, Células de Córnea cultivadas em meios suplementados com SFB em
73 concentrações de 2 a 5% (Abreu *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 2005;
74 Nascimento *et al.*, 2014; Rodrigues *et al.*, 2014)

75 No entanto, a utilização do SFB em cultura celular tem sido questionada, não só
76 por questões de bioética e de bem-estar animal, pois é colhido de fetos de vacas
77 gestantes durante o abate, mas também porque é uma mistura mal definida de
78 componentes e pode conter vários contaminantes como fungos, bactérias, micoplasmas,
79 vírus ou príons. Esta suplementação induz diversas variáveis em protocolos de
80 pesquisas e pode, em certas situações, comprometer a qualidade e a segurança na
81 produção biotecnológica (Hashim *et al.*, 2011; Gstraunthaler *et al.*, 2013).

82 Combinações de meios podem ser testadas para determinar aqueles que
83 resultam em cultivos com crescimento e produtividade com níveis mínimos de SFB.
84 Trabalhos recentes têm demonstrado que cultivo de células BHK 21, CHO e HEK-293
85 podem ser realizados em Meio Eagle Modificado por Dulbecco's (DMEM), a mistura

86 de nutrientes F12 (HAN'S F12) e o Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) com
87 quantidade reduzida de SFB ou sem sua adição (Brunner *et al*, 2010; Zhu, 2012).

88 Considerando os aspectos bioéticos, de biossegurança, a necessidade de alta
89 reprodutibilidade dos ensaios com baixo teor de proteínas exógenas, bem como o
90 elevado custo, seria altamente desejável a redução ou eliminação do SFB em culturas
91 celulares (Rauch *et al.*, 2011).

92 Neste sentido, objetivou-se com este trabalho avaliar, pela imunodifusão em gel
93 de ágar (IDGA), antígenos do vírus CAEV produzidos em células de córnea de feto
94 caprino (CorFC) cultivadas com baixo teor de soro fetal bovino.

95 **Material e Métodos**

96 Células da linhagem CorFC, oriunda de córnea de feto caprino, a partir da quinta
97 passagem, mantidas com meio essencial mínimo de Eagle (MEM) (GIBCO Cat. N°
98 61100-061), contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina B, foram adaptadas aos
99 meios DMEM/F12 (GIBCO Cat. N° 12400-024) e RPMI 1640 (GIBCO Cat. N° 23400-
100 021). Este trabalho seguiu as normas do Comitê de Ética para Uso de Animais da
101 Universidade Federal Rural de Pernambuco – CEUA/ UFRPE, conforme licença
102 número 041/2015.

103 As culturas foram tripsinizadas, a suspensão de células subcultivadas em frascos
104 de 25 cm², com uma concentração inicial de 4×10^4 células/mL, incubadas a 37 °C em
105 sistema fechado para a obtenção de monocamadas semi-confluentes. A adaptação aos
106 meios DMEM/F12 e RPMI 1640 foi feita por mudança direta do meio e redução
107 progressiva da concentração do SFB (GIBCO Cat. N° 12657), de 10%, 5%, 2% e 0,1%,
108 com intervalo de sete dias entre cada etapa.

109 Após o período de adaptação, foi realizada uma curva de crescimento, com base
110 na densidade celular de monocamadas formadas em frascos de 25 cm², semeados com 5
111 mL da suspensão celular com 4×10^4 células/mL. As células foram coletadas por
112 tripsinização a cada 24 h por um período de 168 h para os grupos MEM, DMEM/F12 e
113 RPMI 1640 nas concentrações 2% e 0,1% de SFB. A concentração celular foi
114 determinada utilizando hemacitômetro de *Neubauer*, com contagem celular feita em
115 quadruplicata com auxílio de um microscópio óptico. A diferenciação entre as células
116 viáveis e não viáveis foi feita pela adição do corante Azul de Tripán na concentração de
117 0,4 M (Sigma T-8154) (Freshney, 2005).

118 Para produção de partículas virais foi empregada a amostra CAEV Cork
119 inoculada em células da linhagem CorFC. As monocamadas semi-confluentes de CorFC
120 cultivadas em MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640 suplementados com 0,1% de SFB,
121 foram inoculadas com 0,5 mL da amostra viral com título de $10^{-4,5}$. A partir do 10º dia
122 pós-inoculação (PI), a cada 7 dias, o sobrenadante de cada cultura foi coletado e
123 congelado. Quando as monocamadas apresentaram mais de 70% de destruição, as
124 garrafas foram congeladas.

125 Os antígenos (Ag MEM, Ag DMEM/F12 e Ag RPMI 1640) foram preparados
126 por concentração por diálise. Os sobrenadantes foram congelados e descongelados três
127 vezes, clarificados por centrifugação a 3.300 g por 20 minutos, a 4 °C e dialisados em
128 membrana (THOMAS SCIENTIFIC Swedesboro, NJ, USA 3787-d10), contra
129 polietilenoglicol (PEG 6.000) a 40% em PBS (pH 7,6), a 4 °C durante 48 a 72 h até a
130 concentração de aproximadamente 50 vezes, quando foi coletado e armazenado a -20
131 °C. O antígeno foi diluído em PBS (pH 7,6) e titulado com diluições duplas, frente ao
132 soro controle positivo do kit para diagnóstico de CAE (IDGA) (Kit para diagnóstico de
133 CAE – IDGA; Unika biotech, Recife) e usado como duas unidades precipitantes (UP).

134 A avaliação dos antígenos foi realizada com a micro-IDGA descrita por Arruda
135 *et al.* (2011), utilizando agarose a 1% em tampão borato, um molde em forma
136 hexagonal, com os poços destinados ao antígeno e o soro padrão com capacidade para
137 10 µl, e para os soros a serem testados com capacidade para 30 µl. A leitura foi
138 realizada com 24 e 48 horas, com luz indireta sobre fundo escuro.

139 A comparação dos antígenos (Ag MEM, Ag DMEM/F12 e Ag RPMI 1640) foi
140 feita por amostragem não probabilística, por conveniência. Foram testadas 163 amostras
141 (28 positivas e 135 negativas), colhidas de caprinos de rebanhos do Estado de
142 Pernambucano, previamente testadas para CAEV (Kit para diagnóstico de CAE –
143 IDGA; Unika biotech, Recife). Os resultados dos soros testados com os três antígenos
144 foram avaliados com base no indicador de concordância ajustada - kappa (McGinn *et*
145 *al.*, 2004). Posteriormente o Ag selecionado foi avaliado comparativamente com o
146 antígeno comercial (Kit para diagnóstico de CAE – IDGA; Unika biotech, Recife). As
147 amostras que apresentaram resultado divergente foram testadas por um ELISA
148 comercial para LVPR (Unika biotech, Recife).

149 O número mínimo de amostras para a comparação entre o teste de IDGA
150 realizado com o Ag selecionado e o antígeno comercial foi determinado conforme a
151 fórmula $n \geq z^2 \cdot p \cdot (1-p) / e^2$ (TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel, 2010). Onde: $z =$
152 1,96 para 95% de intervalo de confiança; $p = 0,85$ (para 85% de sensibilidade - Se) ou
153 0,99 (para 99% de especificidade - Sp); $e = 0,05$ (5% de erro) / $e = 0,01$ (1% de erro)
154 respectivamente. Assim, o número mínimo calculado de amostras positivas foi de 196 e
155 o número mínimo de amostras negativas de 381. Foram testadas 797 amostras de
156 caprinos dos Estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Paraíba, São Paulo e Rio de
157 Janeiro.

158 Foram calculadas as Se e Sp relativas, (TDR Diagnostics Evaluation Expert
159 Panel, 2010). A concordância entre os resultados obtidos com o Ag selecionado e o
160 antígeno comercial foi avaliada com base no índice de concordância kappa (McGinn *et*
161 *al.*, 2004).

162 **Resultados e Discussão**

163 Os resultados do efeito dos diferentes meios e concentrações de SFB sobre a
164 proliferação das células CorFC (Figura 1) demonstram que, em linhas gerais, após o
165 processo de adaptação, as mesmas foram susceptíveis aos meios MEM, DMEM/F12 e
166 RPMI 1640. Na passagem com meios na concentração de 2% de SFB as células
167 entraram na fase logarítmica antes de 24 horas em todos os grupos, alcançando a fase
168 estacionária e obtendo o número máximo de células vivas após 144 horas de cultivo,
169 independentemente do meio, contudo os frascos cultivados com RPMI 1640
170 apresentaram maior densidade celular. Na concentração de 0,1% de SFB houve redução
171 de cerca de quatro vezes na taxa de crescimento das células em todos os meios.

172 No geral houve pequena variação no número de células entre os grupos no
173 período de 72 horas. Neste momento o grupo MEM alcançou o *plateau* e logo em
174 seguida iniciou um período de declínio; as células cultivadas com DMEM/F12 e RPMI
175 1640 continuaram em crescimento exponencial, estabelecendo sua fase estacionária com
176 144 horas.

177 A densidade e a alta viabilidade celular obtidas com os meios MEM,
178 DMEM/F12 e RPMI 1640 demonstram a capacidade de suporte nutricional desses
179 meios para cultivo das células CorFC mesmo em baixo nível sérico. A reduzida
180 concentração celular nas passagens com 0,1% de SFB comparativamente a 2%,

181 conforme ilustrado na figura 2, deve-se à redução dos fatores de proliferação celular
182 contidos no SFB necessários à maioria dos tipos de células animais, quando cultivadas
183 *in vitro* (Brunner *et al.*, 2010; van der Valk *et al.*, 2010; Gstraunthaler *et al.*, 2013). Uma
184 vez que o uso de baixa concentração celular para replicação viral comprometeria o
185 processo de obtenção de partículas virais de forma produtiva (Chen e Chen, 2009;
186 Brunner *et al.*, 2010), a suplementação com 2% de SFB seria recomendada para
187 passagens de células CorFC nos subcultivos e a de 0,1% para manutenção celular e
188 inoculação viral, empregando-se os meios MEM, DMEM/F12 e RPMI 1640.

189 A redução na concentração de SFB nos meios de cultivo celular é um passo
190 importante para resolver ou minimizar certos problemas relacionados ao seu uso. Com
191 base nos resultados, observa-se que, no cultivo de células CorFC, é possível reduzir a
192 concentração de SFB em 5 a 10 vezes (de 10-20% para 2%), para o meio de passagem
193 celular, e 20 vezes (2% para 0,1%) para o meio de manutenção. Isto é altamente
194 desejável, pois implica na necessidade de menos coletas de SFB, reduzindo seu impacto
195 negativo ao bem-estar animal, bem como, em menor risco de contaminação exógena
196 associada ao SFB (Van der Valk *et al.*, 2004; Falkner *et al.*, 2006; Brunner *et al.*, 2010;
197 Rauch *et al.*, 2011; Gstraunthaler *et al.*, 2014).

198 A possibilidade de reduzir a concentração de SFB a níveis tão baixos na
199 suplementação dos meios de cultivo deve ser atribuída não apenas à qualidade dos
200 meios DMEM/F12 e RPMI 1640, mas a interação desses com a alta capacidade de
201 multiplicação das células CorFC, o que é uma característica das linhagens contínuas
202 (WHO, 2013).

203 As células CorFC demonstraram-se permissíveis à replicação do vírus CAEV
204 independente do meio (Figura 3), contudo houve variação quanto à necessidade de
205 concentração dos sobrenadantes para obtenção dos antígenos na titulação de 2 UP:
206 MEM (sobrenadante concentrado 56 vezes), DMEM/F12 (35 vezes) e RPMI 1640 (27
207 vezes). As variações no rendimento e na concentração possivelmente estão relacionadas
208 à densidade celular, que se mostrou crescente nessa mesma ordem. Do ponto de vista do
209 processo produtivo e do produto final, a necessidade de menor concentração do
210 sobrenadante para produção do antígeno implica em maior rendimento, com menor
211 custo, e em um produto (antígeno) menos denso e viscoso, o que reduz, durante os
212 testes, resíduos retidos na ponteira de pipetagem, o que é desejável, sobretudo quando

213 se utiliza a micro-IDGA (Arruda *et al.*, 2011) como teste sorológico, que emprega
214 apenas 10 µL do antígeno.

215 O antígeno Ag RPMI 1640, que apresentou melhor qualidade das linhas de
216 precipitação na micro-IDGA e melhor rendimento (menor quantidade de meio de
217 cultura e SFB/mL de antígeno), foi avaliado comparativamente com o antígeno
218 comercial (Kit para diagnóstico de CAE – IDGA; Unika biotech, Recife).

219 Das 163 amostras de soros testados, 28 (17,17%) apresentaram resultados
220 positivos para o grupo MEM e DMEM/F12, e 29 (17,79%) para o grupo RPMI 1640.
221 Comparando os testes (Tabela 1) observa-se concordância ajustada de *kappa* quase
222 perfeita (McGinn *et al.*, 2004): MEM - DMEM/F12 ($kappa = 1,00$), MEM - RPMI 1640
223 e DMEM/F12 - RPMI 1640 ($kappa = 0,98$).

224 Na avaliação qualitativa, as reações de precipitação entre Ag e anticorpo
225 observadas em todos os testes são boas, bem como o tempo de 24 h de incubação para a
226 formação das linhas de precipitação estão de acordo com Arruda *et al.* (2011) para
227 micro-IDGA. Entretanto, as linhas formadas pelo Ag RPMI 1640 apresentavam-se mais
228 luminosas e equilibradas em relação ao soro padrão que aos demais grupos, creditando-
229 se tal fato a menor concentração, pois é bem conhecido que a alta concentração de
230 proteínas do SFB dificulta a obtenção das proteínas desejáveis em cultivo celular, como,
231 por exemplo, os antígenos virais a serem utilizados na produção de vacinas ou em kits
232 de diagnóstico (Simard *et al.*, 2001; Durocher e Butler, 2009; Van der valk *et al.*, 2010).

233 O teste dos 797 soros com o Ag comercial apresentou 216 positivos e 581
234 negativos; com o Ag RPMI 1640 foram observados 225 resultados positivos e 572
235 negativos, correspondendo a Se e Es relativas de 100% e 98,45%, respectivamente, com
236 concordância ajustada *kappa* de 0,97 (Tabela 2), considerada quase perfeita (McGinn *et al.*,
237 2004).

238 Apesar dos avanços de outras alternativas, como os ensaios imunoenzimáticos
239 (De Andrés *et al.*, 2005; Brinkhof e Van Maanen, 2007; De Andrés *et al.*, 2013), a
240 IDGA ainda é o teste laboratorial mais difundido para o diagnóstico das LVPR, devido
241 à sua grande aceitação, ao custo relativamente baixo, à boa sensibilidade e
242 especificidade, além da praticidade de execução e da leitura ser feita sem necessitar de
243 equipamento. O Ag RPMI 1640 mostrou desempenho semelhante ao antígeno
244 comercial, com elevadas sensibilidade e especificidade relativas, no teste de IDGA.

245 **Conclusão**

246 Dependendo do tipo de célula e meio utilizado pode-se produzir antígenos de
247 LVPR com baixo teor de SFB, que corrobora com o bem estar animal, representa
248 redução de custos com insumos e nos processos de purificação de proteínas.

249 **Agradecimentos**

250 Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a
251 Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)
252 pelos recursos financeiros e concessão de bolsas.

253 **Referências**

254 ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de
255 antígeno nucleoproteico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e comparação com o do
256 vírus Maedi- Visna para utilização em teste de imunodifusão em agar gel. **Pesquisa**
257 **Veterinária Brasileira**. v.18, n.2, p.57-60, 1998.

258 ARRUDA, E. T.; OLIVEIRA, M. M. M.; NASCIMENTO, S. *et al.* Avaliação de uma
259 microimunodifusão em gel de ágar para diagnóstico de lentivírus de pequenos
260 ruminantes (LVPR) em caprinos. **Ciência Animal Brasileira**., Goiânia, v.12, n.3, p.
261 560-565, 2011.

262 BRINKHOF, J. e VAN MAANEN, C. Evaluation of five enzyme-linked
263 immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies
264 to small ruminant lentiviruses. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 14, p. 1210–1214, 2007

265 BRUNNER, D., FRANK, J., APPL, H. *et al.* Serum free cell culture: the serum-free
266 media interactive online database. **ALTEX** v. 27, p. 53-62, 2010.

267 BUTLER, M. **Cell culture and upstream processing. In: Technology (ESACT) and**
268 **Protein Expression in Animal Cells (PEACe)**. New York: Taylor & Francis Group,
269 2007. 202p.

270 CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M. G. A Labelled
271 avidin biotin ELISA to detect antibodies to caprine-artrhtis encephalitis in goat sera.
272 **Veterinary Research Communications**, v. 23, p. 515-522, 1999.

273 CASTRO, R. S. e MODOLO, J. R. Lentiviroses de pequenos ruminantes. In: MEGID,
274 J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de**
275 **companhia** 1ª Edição. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 67, p. 730-735.

276 CHEN T., CHEN K. Investigation and Application Progress of Vero Cell Serum-free
277 Culture. **International Journal of Biology**, v.1, p 41-47, 2009.

278 DE ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J. *et al.* Diagnostic tests for small ruminant
279 lentiviruses **Veterinary Microbiology**. v. 107, p. 49-62, 2005.

280 DE ANDRÉS, X.; RAMÍREZ, H.; BERTOLOTTI, L. *et al.* I. An insight into a
281 combination of ELISA strategies to diagnose Small Ruminant Lentivirus infections.
282 **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 152, p. 277–288, 2013.

283 DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein
284 production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20; p. 700–707, 2009.

285 EIBL, D.; EIBL, R.; PÖRTNER, R. **Mammalian Cell Culture Technology: An**
286 **Emerging Field**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. 363p.

287 FALKNER A. B. E.; APPL B. H.; EDER B. C. *et al.* Serum free cell culture: The free
288 access online database **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 395–400, 2006.

289 FRESHNEY R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 15. ed.,
290 New York: John Wiley & Sons, Inc 2005. 580p

291 GSTRAUNTHALER, G., LINDL T., VAN DER VALK J. A plea to reduce or replace
292 fetal bovine serum in cell culture media **Cytotechnology**, v. 65, p.791-793, 2013.

293 GSTRAUNTHALER, G. A Severe Case of Fraudulent Blending of Fetal Bovine
294 Serum Strengthens the Case for Serum-free Cell and Tissue Culture Applications.
295 **ATLA** 42, p. 207–209, 2014.

296 HASHIM, Y. Z. H.; MEL M.; SALLEH, H. M. *et al.* Serum In Mammalian Cell
297 Culture: Weighing The Challenges of Bioprocessing, Ethics and Animal Welfare **2nd**
298 **International Conference on Professional Ethics and Education in Engineering**,
299 2011

300 KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (ed.). Virus
301 taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International
302 Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier , 2012.

303 MCGINN, T.; WYER, P. C.; NEWMAN, T. B. *et al.* Tips for learners of evidence-
304 based medicine: 3. Measures of observer variability (kappa statistic). **JAMC**, v.171,
305 n.11, p. 1369-73, 2004

306 NASCIMENTO, C. B.; PINHEIRO R. R.; ALVES, F. S. *et al.* Ferramentas diagnósticas
307 de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto

308 Diagnostic tools of small ruminant lentiviruses: standardization of indirect ELISA.
309 **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.1, p. 9-15, 2014

310 PINHEIRO R.R.; GOUVEIA A.M.G.; YORINORI E.H.; ANDRIOLI A. Comparação
311 de três técnicas de produção do antígeno do lentivírus caprino utilizado no teste de
312 imunodifusão em gel de Agar. **Braz J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, 42:453-458,
313 2005.

314 OIE – World Organization of Animal Health
315 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04_CAE_MV.pdf)
316 [04_CAE_MV.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04_CAE_MV.pdf). Acessado em 06 de setembro de 2015.

317 RAUCH, C.; FEIFEL, E.; AMANN, E. *et al.* Alternatives to the Use of Fetal Bovine
318 Serum: Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. *Altex* 28,
319 p. 305-316, 2011.

320 RODRIGUES, A.S.; BRITO, R.L.L.; PINHEIRO, R.R. *et al.* Padronização do Elisa
321 indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina [Standardization
322 of indirect Elisa and Western Blot for diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis].
323 **Arquivos Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.417-424, 2014

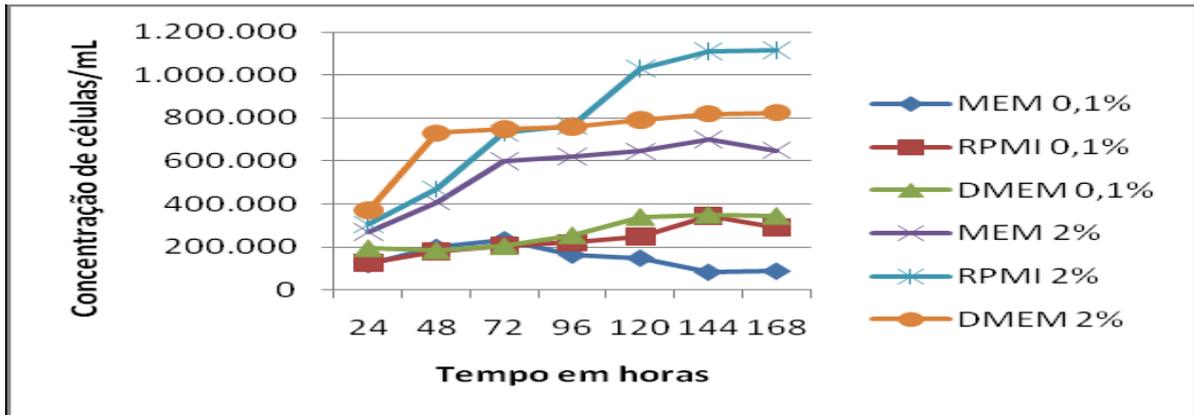
324 SIMARD, C. L.; KIBENGE, M. T.; SINGH, P. *et al.* Simple and Rapid Method for
325 Production of Whole-Virus Antigen for Serodiagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis
326 Virus by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory**
327 **Immunology**, v. 8, p. 352– 356, 2001.

328 TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel – UNICEF/UNDP/WORD BANK/WHO.
329 Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nature*
330 *Reviews – microbiology*, p.S17-S29, 2010.

331 WHO World Health Organization. Recommendations for the evaluation of animal cell
332 cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the
333 characterization of cell banks. **Technical report series**, No. 978, p.79- 187, 2013.

334 VAN DER VALK, J.; MELLOR, D.; BRANDS, R. *et al.* The humane collection of
335 fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. **Toxicology in**
336 **Vitro** v. 18, n.1, p. 1–12, 2004.

337 VAN DER VALK, J., BRUNNER, D., DE SMET, K., *et al.* Optimization of chemically
338 defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro
339 methods. **Toxicology in Vitro** v. 24, 1053-1063, 2010.



340

341 Figura 1. Curva de crescimento de células de CorFC cultivadas em MEM, DMEM/F12

342 e RPMI 1640 suplementados com 0,1% ou 2%

343

344

345

346

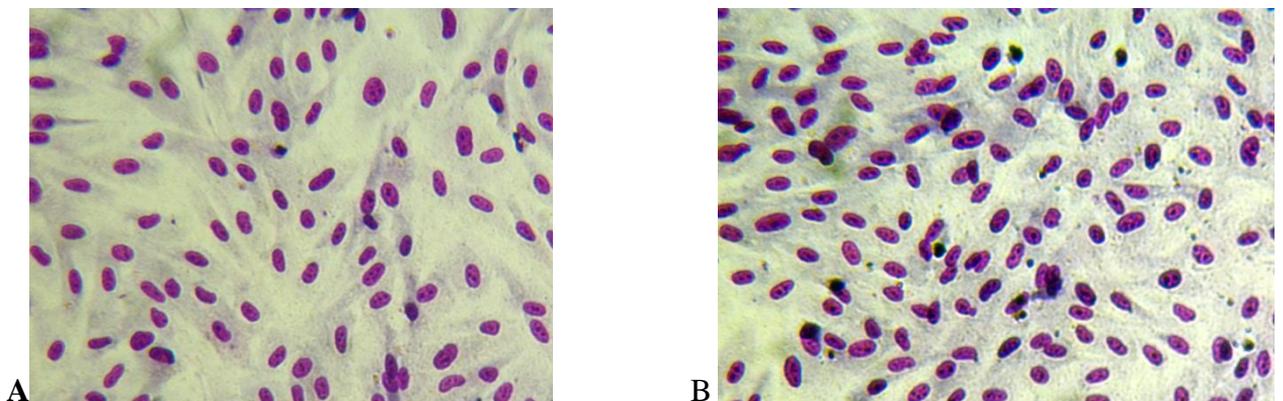


Figura 2. A- Camada de células de córnea CorFC com 72hs de cultivo em meio RPMI 1640 com 0,1% SFB (60x)

347

348

349

350

351

352

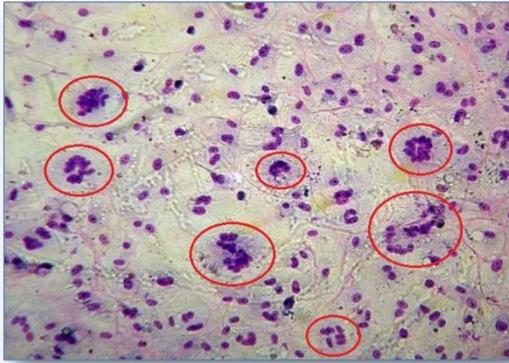


Figura 3. Camada de células de córnea fetal caprina (CorFC) cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 0,1% SFB. Efeito citopático (sincios em destaque) 18 dias pós inoculação (40x). Coloração: panótico

354 Tabela 1 - Índice de concordância ajustada de (Kappa*) segundo o tipo de antígeno em
355 comparação com antígeno Comercial**

Antígeno	Positivo (n=28)	Negativo (n=135)	Kappa
MEM	28	135	1,00
DMEM/F12	28	135	1,00
RPMI 1640	29	134	0,98

356 * McGINN *et al.*, 2004

357 ** Kit para diagnóstico de CAE – IDGA; Unika biotech, Recife

358

359

360

361

362 Tabela 2 - Resultados de soros caprinos testados pelo Imunodifusão em Gel de Agar
 363 (IDGA) com antígeno Comercial* (Ag) e com Ag RPMI 1640.

Antígeno	Comercial		Total
	Positivo	Negativo	
RPMI 1640	Positivo	216	225
	Negativo	0	572
Total		216	581
			797

364 Sensibilidade relativa = 100%; Especificidade relativa = 98,45%; Kappa = 0,97

365

366

367

368

6. EXPERIMENTO II

Desenvolvimento de ELISA indireto para diagnóstico da CAE empregando antígenos obtidos a partir de células CorFC com baixo teor de soro fetal bovino.

1 Desenvolvimento de ELISA indireto para diagnóstico da CAE empregando antígenos
2 obtidos a partir de células CorFC com baixo teor de soro fetal bovino

8 **Resumo**

9 Objetivou-se com este estudo descrever um ELISA indireto (ELISAI RPMI),
10 empregando antígenos virais nativos obtidos por um processo simples de preparação
11 (clarificação, diálise e tratamento com triton X-100) a partir de uma linhagem de células
12 de córnea caprina (células CorFC) cultivada com 0,1% de SFB. Na padronização do
13 ELISAI RPMI, por titulações do antígeno e do conjugado proteína-G peroxidase frente
14 ao soro padrão, observou-se que as melhores diluições foram de 1/50 e de 1/100.000,
15 para o antígeno e o conjugado, respectivamente. Após a padronização foram feitas as
16 avaliações de desempenho do ELISAI, considerando a repetibilidade, definição do
17 ponto de corte, bem como as estimativas de sensibilidade (S) e especificidade (Sp)
18 relativas. Ao avaliar a repetibilidade do ELISAI RPMI observou-se o CV entreplacas de
19 4,4 e 17,3 e entre dias de 5,1 e 18,4, para soros negativo e positivo, respectivamente. Os
20 resultados dos 722 soros testados com os Kits para diagnóstico de LVPR IDGA/ELISAI
21 comerciais apresentou 166 positivos e 556 negativos; com o ELISAI RPMI foram
22 observados 171 resultados positivos e 551 negativos, correspondendo a Se e Sp relativas
23 de 97,59% e 98,38%, respectivamente, com concordância ajustada kappa de 0,95,
24 considerada quase perfeita. Estes resultados demonstram que pode-se estabelecer um
25 ELISA para diagnóstico de LVPR altamente sensível e específico utilizando um modelo
26 simplificado para obtenção de antígenos, empregando células CorFC cultivadas com
27 baixo teor de SFB.

28
29 Palavras-chave: CAEV, RPMI 1640, células de córnea, caprino.

33 **Abstract**

34 The objective of this study describes an indirect ELISA (ELISAI RPMI), employing
35 native viral antigens obtained by a simple preparation process (clarification, dialysis and
36 treatment with triton X-100) from a goat corneal cell line (cells CorFC) cultivated with
37 0.1% FBS. In standardization of RPMI ELISAI by titration of antigen and protein G-
38 peroxidase conjugate against the standard serum, it was observed that the best dilutions
39 were 1/50 and 1 / 100,000 for the antigen and the conjugate respectively. After
40 standardization were made ELISAI the performance evaluations, considering the
41 repeatability cutoff setting and the sensitivity estimates (S) and specificity (SP) on. To
42 assess the repeatability of the observed ELISAI RPMI CV entreplacas 4.4 and 17.3 and
43 between 18.4 and 5.1 days for negative and positive sera. The results of 722 sera tested
44 with the kits for diagnosis of LVPR AGID / commercial ELISAI showed 166 positive
45 and 556 negative; with RPMI were observed ELISAI 171 positive and 551 negative,
46 and if Sp corresponding to about 97.59% and 98.38%, respectively, with agreement
47 adjusted kappa 0.95, considered almost perfect. These results demonstrate that one can
48 establish an ELISA for highly sensitive and specific diagnosis of LVPR using a
49 simplified model for obtaining of antigens, employing CorFC cells with low levels of
50 FBS.

51 Keywords: CAEV, RPMI 1640, corneal cells, goats.

52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64

65 **Introdução**

66 A artrite-encefalite caprina (CAE) foi descrita por Cork *et al.* (1974), nos EUA,
67 como uma encefalite em caprinos jovens e artrite crônica em animais adultos. O vírus
68 da CAE (CAEV) foi isolado e identificado como retrovírus por Crawford *et al.* (1980),
69 semelhante ao vírus Maedi-Visna previamente descrito na Islândia (Thormar e
70 Helgadóttir, 1965; Gudnadóttir e Pálsson, 1967). Esses vírus atualmente são
71 classificados como CAEV e Maedi-Visna (King *et al.*, 2012). Devido às semelhanças
72 estruturais, biológicas, genéticas e a possibilidade de infecção cruzada entre ovinos e
73 caprinos, têm sido denominados Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) (Ramirez
74 *et al.*, 2013).

75 Em geral os vírus CAE e Maedi-Visna infectam células da linhagem monócítico-
76 fagocitária, apresentam elevada taxa de mutação, diversidade genotípica e fenotípica.
77 Esses vírus causam doença crônica, multissistêmica, afetam o bem-estar animal e a
78 produção, devido à ampla distribuição e a ausência de tratamento ou vacinas eficazes
79 (Callado *et al.*, 2001; Reina, 2013; Castro e Modolo, 2016).

80 Os testes sorológicos de diagnóstico têm apoiado a maior parte dos esforços de
81 controle e erradicação por meio da remoção ou separação de animais soropositivos
82 (Herrmann-Hoesing, 2010). A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomenda
83 a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para o
84 diagnóstico das LVPR visando à certificação para trânsito internacional. A IDGA
85 apresenta baixo custo, exigindo poucos equipamentos, facilidade de execução e alta
86 especificidade, porém geralmente apresenta sensibilidade inferior aos ELISA, que
87 mostram outras vantagens, como a possibilidade de automação, o que permite processar
88 um número maior de amostras (OIE, 2015).

89 A IDGA tem sido amplamente utilizada para diagnóstico sorológico das LVPR
90 desde a década de 1980. Mais recentemente, vários ELISA foram descritos, com
91 diferentes níveis de validação, categorizados em ELISA indireto, ELISA sanduíche e
92 ELISA competitivo, empregando, isoladamente ou em associação, proteínas virais
93 nativas purificadas, proteínas recombinantes e peptídios sintéticos (De Andrés *et al.*,
94 2005, 2013; Herrmann-Hoesing, 2010; Ramirez *et al.*, 2013). No Brasil, para
95 diagnóstico da CAE há apenas registros de ELISA indiretos empregando antígenos
96 virais nativos (Castro *et al.*, 1999a; Moreira *et al.*, 2010; Pinheiro 2001; Alves *et al.*,

97 2012; Nascimento *et al.*, 2014). Os processos empregados na obtenção e purificação de
98 antígenos dos LVPR para uso em ELISA são determinantes para sua sensibilidade e
99 especificidade. Diversos métodos vêm sendo utilizados, entretanto empregam
100 protocolos trabalhosos e dispendiosos, envolvendo ultracentrifugação, ultrafiltração e
101 cromatografia (Heckert *et al.*, 1992; Zanoni *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 1999; Nascimento
102 *et al.*, 2014).

103 Recentemente foi estabelecido a linhagem celular CorFC a qual apresenta
104 elevada viabilidade, taxa de multiplicação celular e permissividade a replicação de
105 diversos vírus, inclusive LVPR, em níveis mínimos de soro fetal bovino (SFB)
106 (Nascimento, 2012).

107 Neste trabalho é descrita a padronização de um ELISA indireto (ELISAI RPMI),
108 empregando antígenos virais nativos obtidos por um processo simples de preparação a
109 partir de uma linhagem de células de córnea caprina (células CorFC) cultivada com
110 quantidade mínima de SFB.

111 **Material e Métodos**

112 Para replicação das partículas virais foi empregada a amostra CAEV Cork
113 inoculada em células da linhagem CorFC livres de LVPR, herpesvírus, pestivírus e
114 *Mycoplasma spp*, conforme Nascimento (2012). Este trabalho seguiu as normas do
115 Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco –
116 CEUA/ UFRPE, conforme licença número 041/2015.

117 Frascos de 225 cm² com monocamadas semiconfluentes de CorFC cultivadas em
118 meio RPMI 1640 (GIBCO Cat. N° 23400-021) contendo penicilina, estreptomicina,
119 anfotericina B e suplementados com 0,1% de SFB (GIBCO Cat. N° 12657), foram
120 inoculadas com 3 mL da amostra viral com título de 10^{-4,5}. A partir do 10º dia pós-
121 inoculação (PI), a cada sete dias, o sobrenadante de cada cultura foi coletado e
122 congelado. Quando as monocamadas apresentaram mais de 70% de destruição, as
123 garrafas foram congeladas.

124 Na preparação dos antígenos (Ag), os sobrenadantes foram congelados e
125 descongelados três vezes, clarificados por centrifugação a 3.300 g por 20 minutos, a 4º
126 C e dialisados em membrana (Thomas Scientific Swedesboro, NJ, USA 3787-d10),
127 contra polietilenoglicol (PEG 6.000) a 40% em PBS (pH 7,6), a 4º C durante 48 a 72 h
128 até a concentração de aproximadamente 50 vezes. O antígeno foi tratado com Triton X-

129 100 (Amresco) até a concentração final 0,1% em temperatura ambiente por 20 minutos
130 e com 2×10^{-4} M de Phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF) e armazenado a -20° C.

131 O ELISAI - RPMI foi padronizado de forma a se obter a maior relação P/N
132 (densidade ótica - DO média de soros positivos/DO média de soros negativos). O
133 resultado de cada amostra foi expresso como percentagem de positividade (PP),
134 calculada relativamente à DO do soro controle positivo (considerada 100%) (Wright *et*
135 *al.*, 1993).

136 O antígeno foi diluído em série (1/25, 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400) e titulado
137 frente à diluição de 1/50 de um soro caprino positivo (Kit para diagnóstico de CAE –
138 IDGA; Unika biotech, Recife) e um negativo para LVPR (Goat Serum, New Zealand –
139 Invitrogen). O conjugado proteína-G peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foi titulado
140 frente ao antígeno nas diluições de 1/75.000, 1/90.000 e 1/100.000.

141 O ELISAI – RPMI foi realizado utilizando-se placas de poliestireno de 96 poços
142 com alta capacidade de adsorção (Greiner Bio One). As placas foram sensibilizadas
143 com o antígeno na diluição previamente definida e incubadas em câmara úmida durante
144 duas horas a 37° C. Três lavagens com PBS contendo 0,1% tween 20 (v/v) (PBS-T)
145 foram realizadas e as placas bloqueadas pela adição de PBS contendo leite em pó
146 desnatado (LPD) a 4% (p/v) seguida de incubação por uma hora a 37° C em câmara
147 úmida. Após três lavagens com PBS-T, 100 μ L das amostras de soros diluídas em PBS
148 contendo LPD a 2% (p/v) e 10 mM de EDTA (p/v) foram distribuídas em cada poço. As
149 placas foram incubadas em câmara úmida por uma hora a 37° C. Após nova lavagem
150 com PBS-T, 100 μ L do conjugado de proteína G-peroxidase foram distribuídos por
151 poço e as placas incubadas por mais uma hora e posteriormente lavadas cinco vezes
152 com PBS-T. Em seguida, 100 μ L de solução tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5,0
153 contendo 0,1 mg/ml de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) e 0,02% de peróxido de
154 hidrogênio (v/v) foram adicionados. Após cinco minutos, a reação foi bloqueada com
155 100 μ L de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada
156 com espectrofotômetro a 450 nm.

157 Após a padronização foram feitas as avaliações de desempenho do ELISAI,
158 considerando a repetibilidade, definição do ponto de corte, bem como as estimativas de
159 sensibilidade (S) e especificidade (Sp).

160 A repetibilidade do ELISAI foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação
161 entre cinco placas (interplacas) e entre cinco dias (entre dias) utilizando cinco soros
162 negativos e cinco positivos, conforme recomendação da OIE (2013). O ponto de corte
163 do teste foi determinado com base nos resultados do teste de 78 amostras de soros
164 caprinos previamente testados em série para o controle da CAE (Kit para diagnóstico de
165 CAE – IDGA e ELISAI para LVPR¹). O ponto de corte foi calculado como a média das
166 PP mais três vezes o desvio padrão (Frey *et al.*, 1998).

167 O número mínimo de amostras necessário para a estimativa da Se e da Sp do
168 ELISAI RPMI foi determinado conforme a fórmula $n \geq z^2 \cdot p \cdot (1-p) / e^2$ (TDR Diagnostics
169 Evaluation Expert Panel, 2010). Onde: $z = 1,96$ para 95% de intervalo de confiança; $p =$
170 $0,90$ (para 90% de Se ou de Sp, com base na revisão de De Andreas *et al.*, 2005); $e =$
171 $0,05$ (5% de erro). Assim, o número mínimo calculado de amostras positivas ou
172 negativas foi de 138. Foram testadas 722 amostras de caprinos dos Estados de
173 Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Paraíba, São Paulo e Rio de Janeiro.

174 Para o cálculo da Se e da Sp diagnósticas foi considerado verdadeiro positivo
175 como sendo um animal positivo simultaneamente nos testes de IDGA e ELISA para
176 CAE (Kit para diagnóstico de CAE – IDGA e ELISAI para LVPR); de forma análoga,
177 verdadeiro negativo como sendo um animal negativo para ambos os testes. Foram
178 calculadas as Se e Sp relativas (TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel, 2010). A
179 concordância entre os resultados obtidos com o ELISAI RPMI e os dos Kits comerciais
180 foi avaliada com base no índice de concordância kappa (McGinn *et al.*, 2004).

181 **Resultados**

182 As células CorFC cultivadas com baixo teor de SFB demonstraram-se altamente
183 permissíveis à replicação do vírus CAEV, mesmo com um número superior a 40
184 passagens, resultando em 8 colheitas de sobrenadantes e rendimento de 1,2 L de
185 sobrenadante para cerca de 2.000 testes.

186 Após a realização de ensaios para padronização do ELISAI RPMI, por titulações
187 do Ag e do conjugado proteína-G peroxidase frente ao soro padrão, observou-se que as
188 melhores diluições foram de 1/50 e de 1/100.000, para o antígeno e o conjugado,
189 respectivamente, com DO do branco de 0,042 nm

¹ Os kits foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante - Unika Biotech, Recife.

190 Ao avaliar a repetibilidade do ELISAI RPMI observou-se o CV entreplacas de
191 4,4 e 17,3 e entre dias de 5,1 e 18,4, para soros negativo e positivo, respectivamente. O
192 ponto de corte estabelecido com o teste de 78 soros foi de 20 PP.

193 Os resultados dos 722 soros testados com os Kits para diagnóstico de LVPR
194 IDGA/ELISAI comerciais apresentou 166 positivos e 556 negativos; com o ELISAI
195 RPMI foram observados 171 resultados positivos e 551 negativos, correspondendo a Se
196 e Sp relativas de 97,59% e 98,38%, respectivamente, com concordância ajustada kappa
197 de 0,95 (Tabela 1).

198 **Discussão**

199 Os LVPR encontram-se amplamente disseminados no Brasil, distribuídos com
200 prevalência proporcionalmente crescente à medida que os rebanhos caprinos são
201 especializados para produção leiteira; nos nativos ou sem raça definida a prevalência é
202 baixa, porém tende a crescer à medida que animais leiteiros são introduzidos nos
203 rebanhos (Saraiva Neto *et al.*, 1995; Alves & Pinheiro, 1997; Silva *et al.*, 2005;
204 Bandeira *et al.*, 2009). Embora inexista um programa oficial de combate à infecção no
205 país, tem-se adotado medidas de controle que usam como critério de triagem dos
206 animais a IDGA. É genericamente aceito que os ELISA são mais sensíveis do que a
207 IDGA para o diagnóstico das LVPR (De Andrés *et al.*, 2005; Herrmann-Hoesing,
208 2010). No Brasil, para diagnóstico da CAE há apenas relatos de ELISA indiretos
209 empregando antígenos virais nativos (Castro *et al.*, 1999a; Moreira *et al.*, 2010; Alves *et*
210 *al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2014). O ELISAI descrito neste trabalho foi padronizado
211 empregando antígenos virais nativos obtidos por um processo simples de preparação a
212 partir de um novo sistema de cultivo celular (células CorFC) que requer quantidade
213 mínima de SFB.

214 Os antígenos do ELISAI RPMI foram obtidos, com elevado rendimento, a partir
215 de células CorFC suplementadas com 0,1% de SFB, ao contrário dos já relatados que
216 usam de 2% (Castro *et al.*, 1999a; Pinheiro, 2001; Oliveira *et al.*, 2010), o que foi
217 possível devido à alta permissividade e capacidade de multiplicação das células CorFC
218 (Nascimento, 2012), característica das linhagens celulares contínuas (WHO, 2013). O
219 emprego de baixas concentrações de SFB nos cultivos celulares facilita a obtenção de
220 antígenos virais, reduz o risco de contaminação das culturas celulares associada ao SFB,

221 bem como o impacto negativo ao bem-estar animal, resultante da necessidade de menos
222 coletas de fetos bovinos (Brunner *et al.*, 2010; Gstraunthaler *et al.*, 2014).

223 Diferentemente de outros protocolos, que demandam excessos de manipulação,
224 uso de cromatografia, filtração sob pressão, centrifugação em gradiente e/ou
225 ultracentrifugação (Zanoni *et al.* 1994; Castro *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2010; Alves *et*
226 *al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2014) foi utilizado um modelo simplificado para obtenção
227 dos antígenos, envolvendo poucas etapas (clarificação, diálise e tratamento com triton
228 X-100). A opção pelo uso do triton X-100 deve-se ao fato de ser um detergente não
229 iônico, considerado suave e não desnaturante, pois realiza a ruptura lípido-lípido e
230 proteína-lípido, resultando no isolamento e solubilização das proteínas, sem alterar a
231 forma original (Seddon *et al.*, 2004).

232 Na padronização do ELISAI-RPMI obteve-se um protocolo capaz de ter um bom
233 rendimento dos principais componentes da reação (antígeno 1/50 e conjugado
234 1/100.000) e baixo background. O teste apresentou alta repetibilidade, com CV
235 interplacas e entre dias inferiores a 20%, considerado adequado para um ELISA (OIE,
236 2013). O resultado de cada amostra foi expresso como PP, conforme consenso definido
237 pela Organização Mundial da Saúde (OMS/FAO) e Agência Internacional de Energia
238 Nuclear (IAEA) para expressão de resultados de ELISA indireto, pois minimiza as
239 variações entre placas (Wright *et al.*, 1993).

240 Quando o ELISAI RPMI foi avaliado considerando os principais atributos de um
241 teste diagnóstico, obteve-se alta Se (97,59%) e Sp (98,38%), com concordância ajustada
242 kappa de 0,95, considerada quase perfeita (McGinn *et al.*, 2004), em relação aos
243 resultados da IDGA e de um ELISA comerciais. Para comparação de testes para
244 diagnóstico de LVPR o ideal seria dispor de um teste de referência, como a
245 radioimunoprecipitação e o western blot, para classificação da população em
246 verdadeiros positivos e verdadeiros negativos (Herrmann-Hoesing, 2010). Diante da
247 indisponibilidade desses testes, foi adotado a associação dos resultados da IDGA e de
248 um ELISAI em série, o que é recomendado para situações em que há dificuldade para
249 definição dos verdadeiros positivo e negativo (Martin, 1977).

250 Uma das características dos ELISA é a versatilidade de composição e
251 combinações dos seus reagentes. O principal constituinte que interfere de forma mais
252 intensa com a sensibilidade e a especificidade do teste é o antígeno. Os LVPR têm alta

253 capacidade de mutação, resultando em importante variabilidade genotípica e fenotípica,
254 daí a existência de cinco genótipos – A, B, C, D e E. Os genótipos A e B são os mais
255 frequentes e correspondem ao vírus Maedi-Visna e CAE, respectivamente (Shah *et al.*,
256 2004; Reina *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2013). No Brasil, como na maioria dos países,
257 não se sabe com precisão quais são os genótipos circulantes. Em estudo sobre a
258 caracterização genética e antigênica dos LVPR das regiões nordeste, sudeste e sul foi
259 evidenciado, principalmente, a presença do tipo B nos rebanhos caprinos (Castro *et al.*,
260 1999b; Ravazollo *et al.*, 1999; Braz, 2013).

261 Pelo exposto, estrategicamente os antígenos empregados no ELISAI RPMI
262 foram produzidos a partir de culturas celulares infectadas com a amostra CAEV Cork,
263 pertencente ao grupo B. Considerando que ELISA com base na proteína total do vírus
264 devem ter um espectro antigênico mais amplo em comparação com ELISA que se
265 baseiam em peptídeo sintético ou proteína recombinante, podendo resultar em maior
266 capacidade de detecção dos ELISA para diagnóstico das LVPR, seria prudente o uso de
267 várias amostras virais para produção antigênica (De Andrés *et al.*, 2013).

268 **Conclusões**

269 Pode-se estabelecer um ELISA indireto para diagnóstico de LVPR altamente
270 sensível e específico utilizando um modelo simplificado para obtenção de antígenos,
271 empregando células CorFC cultivadas com baixo teor de SFB.

272 Desta feita, o desenvolvimento de testes mais acessíveis e econômicos poderá
273 contribuir para a realização de estudos epidemiológicos mais amplos, bem como
274 subsidiar à condução dos programas de controle nos rebanhos positivos e às medidas
275 preventivas nas criações indenens.

276

277 **Agradecimentos**

278 Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a
279 Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)
280 pelos recursos financeiros e concessão de bolsas.

281

282 **Referências**

283 ALVES, L.A.O.; TEIXEIRA, M.F.S.; PINHEIRO, A.A. *et al.* Produção de antígeno e
284 separação da proteína p28 por microfiltragem seriada para sorodiagnóstico da artrite

285 encefalite caprina por ensaio imunoenzimático **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64,
286 n.4, p.935-942, 2012.

287 BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O. *et al.* Seroprevalence of
288 caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba State, Brazil.
289 **The Veterinary Journal** (London, England. 1997), v. 180, p. 399-401, 2009.

290 BRAZ, G. F. Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização genética e antigênica
291 de isolados de caprinos e ovinos do Brasil. 2013. Tese (doutorado) – Universidade
292 Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

293 BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H. *et al.* Serum free cell culture: the serum-free
294 media interactive online database. **Altex**, v. 27, p. 53-62, 2010.

295 CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentiviruses of small
296 ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. **Pesquisa Veterinária**
297 **Brasileira**, v. 21. n.3. p.87-97, 2001.

298 CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M. G. A Labelled
299 avidin biotin ELISA to detect antibodies to caprine-arthritis encephalitis in goat sera.
300 **Vet. Res. Comm.**, v. 23, p. 515-522, 1999a.

301 CASTRO, R. S., LEITE, R. C.; RESENDE, M. *et al.* Conserved sequence motifs
302 involving the tat reading frame of brasilian caprine lentiviruses indicate affiliations to
303 both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. **J. General Virology**, v.
304 80, p. 1583-1589, 1999b.

305 CASTRO, R. S. e MODOLO, J. R. Lentiviruses de pequenos ruminantes. In: Megid, J.;
306 Ribeiro, M. G.; Paes, A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de
307 companhia 1ª Edição. Rio de Janeiro: Roca, 2016. Cap. 67, p. 730-735.

308 CORK, L.C.; HADLOW, W.J; CRAWFORD, T.B. Infectious leukoencephalomyelitis
309 of young goats. **Journal of Infectious Disease**, v.129, p.134-141, 1974.

310 CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic
311 arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v.207, p.997-999, 1980.

312 DE ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J. Diagnostic tests for small ruminant
313 lentiviruses **Veterinary Microbiology**. v. 107, p. 49-62, 2005.

314 DE ANDRÉS, X.; RAMÍREZ, H.; BERTOLOTTI, L. *et al.* An insight into a
315 combination of ELISA strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections.
316 **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, p. 277–288, 2013.

317 FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI D. A statistically defined endpoint titer
318 determination method for immunoassays. **J. Immunol. Methods**. 221(1-2):35-41, 1998.

319 GSTRALTHALER, G.; LIND, T.; VAN DER VALK, J. A Severe Case of Fraudulent
320 Blending of Fetal Bovine Serum Strengthens the Case for Serum-free Cell and Tissue
321 Culture Applications. **Atla**, v.42, p. 207–209, 2014.

322 GUDNADOTTIR, M., PALSSON, P.A. Transmission of maedi by inoculation of a
323 virus grown in tissue culture from maedi-infected lungs. **J. Infect. Dis.**, v.117, p.1-6,
324 1967.

325 HECKERT, R.A; MCNAB, W.B.; RICHARDSON, S.M.; BISCOE, M.R. Evaluation of
326 an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine
327 arthritisencephalitis virus in goat serum. **Canadian Journal Veterinary Research**,
328 v.56, p.237-241, 1992.

329 HERRMANN-HOESING, L. M. Diagnostic assays used to control small ruminant
330 lentiviruses. **J Vet Diagn Invest**, v. 22, p. 843–855, 2010.

331 KING, A.M.Q.; ADAMS, M.J.; CARSTENS, E.B.; LEFKOWITZ, E.J. (ed.). Virus
332 taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International
333 Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier, 2012.

334 MCGINN, T.; WYER, P. C.; NEWMAN, T. B. Tips for learners of evidence-based
335 medicine: 3. Measures of observer variability (kappa statistic). **JAMC**, v.171, n.11, p.
336 1369-73, 2004.

337 NASCIMENTO, S. A. 2012. Descrição de uma linhagem de células de córnea fetal
338 caprina (CorFC) naturalmente imortalizada: cultivo em meios com baixo teor de soro
339 fetal bovino e uso para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina
340 (CAEV) / 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) UFRPE , Recife.

341 NASCIMENTO, C. B.; PINHEIRO R. R.; ALVES, F. S. Ferramentas diagnósticas de
342 Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto.
343 **Arquivos Instituto Biológico**, v.81, n.1, p. 9-15, 2014.

344 OIE, Terrestrial Manual. Chapter 1.1.5. — Principles and methods of validation of
345 diagnostic assays for infectious diseases. 2013.

346 OIE – World Organization of Animal Health
347 [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04_CAE_MV.pdf)
348 [04_CAE_MV.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2008/pdf/2.07.03-04_CAE_MV.pdf) . Acessado em 06 de setembro de 2015.

349 OLIVEIRA, M. M. M.; CASTRO, R. S.; GOMES, S. M. *et al.* Padronização de um
350 ELISA proteína-G (ELISA-G) para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes
351 (LVPR) em caprinos. **PUBVET**, V. 4, N. 28, Ed. 133, 2010.

352 PINHEIRO, R.R. Vírus da Artrite-Encefalite Caprina: Desenvolvimento e padronização
353 de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-blot) e estudo epidemiológico no Estado do
354 Ceará. 2001. 115 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo
355 Horizonte, 2001.

356 RAMÍREZ, H.; REINA, R.; AMORENA, B. *et al.* Small Ruminant Lentiviruses:
357 Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. **Viruses**, v. 5, p. 1175-1207, 2013.

358 RAVAZOLLO, A.P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E. *et al.* Phylogenetic analysis of
359 small ruminant lentiviruses from southern Brazil. **Virus Res.**, v.79, p.117-123, 2001.

360 REINA, R.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Immunization against Small Ruminant
361 Lentiviruses. **Viruses**, v.5, p. 1948-1963, 2013.

362 REINA, R.; BERTOLOTI, L.; DEI GIUDICI, S.; Small ruminant lentivirus genotype
363 E is widespread in Sarda goat. **Vet Microbiol**, 144, 24–31, 2010.

364 SEDDON, A. M.; CURNOW, P.; BOOTH, P. J. Membrane proteins, lipids and
365 detergents: not just a soap opera. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -**
366 **Biomembranes**, v. 1666, p. 105-117, 2004.

367 SILVA, J. S.; CASTRO, R. S.; MELO, C. B.; FEIJÓ, F. M. Infecção pelo vírus da
368 artrite encefalite caprina em caprinos no Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de**
369 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.6, p. 726-731, 2005.

370 SHAH, C.; BO NI, J.; HUDER, J. B.; *et al.* Phylogenetic analysis and reclassification
371 of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-
372 to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. **Virology**, 319,
373 12–26, 2004.

374 TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel –UNICEF/UNDP/WORD BANK/WHO.
375 Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature**
376 **Reviews – microbiology**, p.S17-S29, 2010.

377 THORMAR H.; HELGADOTTIR H. A comparison of visna and maedi viruses. II.
378 Serological relationships. *Res. Vet. Sci.* 6:456-465, 1965.

379 WHO World Health Organization. Requirements for the use of animal cells as in vitro
380 substrates for the production of biologics. **Technical report series**, No. 978, p.19- 56,
381 2013.

382 WRIGHT, P. F; NILSSON, E.; VAN ROOIJ, E. M. A. *et al.* Standardisation and
383 validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of
384 antibody in infectious disease diagnosis. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 12 (2), 435-450,
385 1993.

386 ZANONI, R.G.; VOGT, H.R.; POHL, B. *et al.* An ELISA based on whole virus for the
387 detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. **Zentralblattfür**
388 **Veterinärmedezin**, v. 41, p. 662-669, 1994.

389

390 **Tabela 1 - Resultados do teste de soros caprinos com o ELISAI RPMI**

Teste		IDGA/ELISAI*		Total
		Positivo	Negativo	
ELISAI	Positivo	162	9	171
RPMI	Negativo	4	547	551
Total		166	556	722

391 *Kit para diagnóstico de CAE – IDGA e Kit ELISAI para LVPR (Unika Biotech, Recife).

392 Sensibilidade = 97,59%; Especificidade = 98,38%; *Kappa* = 0,95

393

394