



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

**MICHELE MOREIRA MARTINS DE OLIVEIRA**

**DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS  
RUMINANTES (LVPR) EM CAPRINOS**

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

Orientação:

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro

Co-orientação:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Almeida de Melo  
Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade

Recife – PE  
2007

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

O48d Oliveira, Michele Moreira Martins de  
Diagnóstico e controle de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos / Michele Moreira Martins de Oliveira. -- 2007.  
114 f. : il.

Orientador : Roberto Soares de Castro  
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária.

Inclui bibliografia.

CDD 616.075

1. LVPR
2. Diagnóstico
3. IDGA
4. *Western blot*
5. Controle
  - I. Castro, Roberto Soares de
  - II. Título



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

**DIAGNÓSTICO E CONTROLE DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS**  
**RUMINANTES (LVPR) EM CAPRINOS**

Tese de Doutorado elaborada por

MICHELE MOREIRA MARTINS DE OLIVEIRA

Aprovada pela  
COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Almeida de Melo  
(Unidade Acadêmica de Medicina veterinária/CSTR/UFCG)

---

Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade  
(Departamento de Genética/UFPE)

---

Prof. Dr. Edísio Oliveira de Azevedo  
(Unidade Acadêmica de Medicina veterinária/CSTR/UFCG)

---

Dr<sup>a</sup>. Carla Lopes de Mendonça  
(Clínica de Bovinos de Garanhos/UFRPE)

---

Dr. José Augusto Bastos Afonso da Silva  
(Clínica de Bovinos de Garanhos/UFRPE)

Recife, Fevereiro de 2007

*Ao meu esposo Kléber, meu  
grande e verdadeiro amor, e  
a meus filhos Mariana e  
João Victor, os maiores  
presentes que DEUS poderia  
ter me dado*

*Dedico*

*Aos meus pais e meu irmão,*

*Ofereço*

*“Ando devagar porque já tive pressa  
E levo esse sorriso, porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe...  
Eu só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei  
Conhecer as manhãs e as manhãs, o sabor das massas e das maçãs,  
É preciso amor pra poder pulsar, é preciso paz pra poder sorrir,  
É preciso chuva para florir.  
Penso que cumprir a vida seja simplesmente  
Compreender a marcha, e ir tocando em frente  
Como um velho boiadeiro levando a boiada,  
Eu vou tocando os dias pela longa estrada eu vou,  
Estrada eu sou  
Todo mundo ama um dia, todo mundo chora,  
Um dia a gente chega, no outro vai embora  
Cada um de nós compõe a sua própria história,  
E cada ser em si, carrega o dom de ser capaz,  
De ser feliz”*

*(Almir Sater e Renato Teixeira)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir a concretização de mais um sonho.

Ao meu esposo, Kléber, porto seguro da minha vida, pelo seu amor incondicional, apoio, carinho, dedicação, paciência, companheirismo, amizade...

A meus filhos Mariana e João Victor, por existirem na minha vida

A meus pais, responsáveis pela minha existência, pelo seu amor, carinho, apoio, dedicação e por terem me dado condições de realizar os meus sonhos.

A meu irmão Rodrigo, pelo carinho, amizade e apoio.

Ao meu orientador e grande amigo, um verdadeiro mestre, Prof. Dr. Roberto Soares de Castro, por todos os ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

Aos co-orientadores e amigos, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Almeida de Melo e ao Prof. Dr. Paulo Paes de Andrade, pelos ensinamentos, colaboração..., e ao *fauzinho* pelas raspinhas de bochechas...

Aos amigos de doutorado Taciana Galba, Taciana Ramalho, Silvio Abreu.... por todos os momentos que passamos juntos, principalmente na reta final....

Aos amigos WalbertFran, Hamilton e Hailton... que mesmo de longe se preocuparam comigo e me fortaleceram quando as forças estavam acabando.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílian Gregory e o seu esposo Arnaldo por terem me recebido em sua casa em um momento desesperado em que viajei para São Paulo na tentativa de conseguir fazer um PCR na USP.

À grande amiga Edna Isabel Chérias pela atenção, amizade e dedicação.

À amiga Sheila Machado Gomes pela ajuda em todos os momentos, pelas viagens inesquecíveis, por nos perder em uma viagem que ela era a guia, e por me agüentar nos momentos de maior desespero.

À amiga Ana Cláudia Campos pela amizade e ajuda em momentos difíceis.

À amiga Inês, sempre bem humorada e com uma palavra de apoio, pela ajuda.

Ao amigo Sérgio, pelo apoio, ajuda e pelos conselhos em todos os momentos de dificuldade.

À amiga Rosana Leo, pelo apoio nos momentos difíceis, as palavras de conforto e as orações.

Ao amigo Dimas Bandeira “*in memorian*” pelos ensinamentos de vida.

Aos amigos Renato, Betânia, Carminha e Nildo, pela amizade, apoio, carinho em todos estes anos de convivência.

A Dalva e Aderaldo por me receberem bem e me ajudarem em algumas etapas deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa, durante o curso.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo suporte financeiro.

Aos animais, sem os quais seria impossível a minha existência profissional.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente, ajudaram e contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal... a estes serei sempre grata.

## SUMÁRIO

	Pág.
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
3.1 LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR).....	21
3.1.1 Classificação, estrutura e replicação.....	21
3.1.2 Infecção <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	27
3.2. LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES .....	32
3.2.1 Aspectos clínicos e anatomohistopatológicos.....	32
3.2.2 Formas de transmissão.....	33
3.2.3 Controle e profilaxia.....	34
3.2.4 Diagnóstico.....	36
3.2.4.1 Métodos Indiretos.....	36
3.2.4.2 Métodos Diretos.....	43
3.3 PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO.....	46
3.4 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS.....	50
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52
<b>EXPERIMENTO I</b>	
<i>Western blot</i> para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos usando protocolo simples para obtenção de antígeno.....	74
<b>EXPERIMENTO II</b>	
Padronização de um ELISA proteína-G (ELISA-G) para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos.....	91
<b>EXPERIMENTO III</b>	
Anticorpos anti-lentivírus em cabritos nascidos por parto induzido alimentados com colostro artificial e colostro tratado termicamente.....	104
<b>5 CONCLUSÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES</b> .....	114



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<p><b>Figura 1 -</b> Estrutura das partículas virais, apresentando a localização das principais proteínas: transcriptase reversa (RT), capsídeo (CA), transmembranar (TM), proteína de superfície (SU) e nucleoproteína (adaptado de COFFIN, 1996).....</p>	22
<p><b>Figura 2 -</b> Estrutura do DNA-proviral do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e do vírus Maedi-Visna (MVV), mostrando a homologia genética entre os genes <i>gag</i> e <i>pol</i>, que promove uma relação antigênica entre eles (CLEMENTES e PAYNE, 1994).....</p>	25
<p><b>Figura 3 -</b> Ciclo de replicação dos retrovírus, demonstrando as etapas desde a adsorção da partícula viral à célula hospedeira até o remonte e brotamento de novas partículas virais (adaptado de COFFIN, 1996).....</p>	26
<p><b>Figura 4 –</b> Etapas do processo de validação de um teste diagnóstico (adaptado OIE, 2006).....</p>	51
<b>EXPERIMENTO I</b>	
<i>Western blot</i> para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos usando protocolo simples para obtenção de antígeno	
<p><b>Figura 1 –</b> Resultado do <i>dot-blot</i> utilizando os soros padrão positivo e negativo (1/400) e conjugado anti-cabra peroxidase (1/100). Em 1) controle negativo do antígeno; 2) antígeno puro; 3 a 8) antígeno diluído 1/2 a 1/64.....</p>	84
<p><b>Figura 2 –</b> Resultado do <i>western blot</i> mostrando reação positiva a quatro proteínas virais de pesos moleculares (em kDa) de 70, 50, 40, 25 e 14-16. 1) antígeno diluído 1/2; 2) antígeno diluído 1/4.....</p>	85
<p><b>Figura 3 –</b> Resultado do <i>immunoblot</i> realizado com oito amostras de soro caprino, positivos para lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) na imunodifusão em gel de agar (IDGA). Em N) Soro padrão negativo; P) Soro padrão positivo; 1 a 8) amostras de soro caprino positivo.....</p>	86

**EXPERIMENTO II**

Padronização de um ELISA proteína-G (ELISA-G) para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos

**Figura 1** – Valores da razão entre soros padrão (positivo/negativo), e soros de campo (8 positivos/10negativos), testados no ELISA-i e ELISA-G..... 100

## LISTA DE TABELAS

		Pág.
<b>Tabela 1 -</b>	Células envolvidas na replicação “ <i>in vitro</i> ” dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	30
<b>Tabela 1(cont.) -</b>	Células envolvidas na replicação “ <i>in vitro</i> ” dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	31
<b>Tabela 2 –</b>	Lista de testes de ELISA utilizados para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	38
<b>Tabela 2 (cont.) –</b>	Lista de testes de ELISA utilizados para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	39
<b>Tabela 3a –</b>	<i>Western blot</i> para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) utilizando antígeno recombinante.....	41
<b>Tabela 3b –</b>	<i>Western blot</i> diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	42
<b>Tabela 4 –</b>	PCR desenvolvidos para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	44
<b>Tabela 4 (cont.) –</b>	PCR desenvolvidos para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	45
<b>Tabela 5 –</b>	Protocolos de purificação de antígeno para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	48
<b>Tabela 5 (cont.) –</b>	Protocolos de purificação de antígeno para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	49

## EXPERIMENTO II

Padronização de um ELISA proteína-G (ELISA-G) para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos

<b>Tabela 1 –</b>	Titulação do antígeno e do conjugado anti-cabra peroxidase utilizando um ELISA indireto (ELISA-i).....	98
<b>Tabela 2 –</b>	Titulação de conjugado proteína-G empregada nos testes de ELISA-G para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).....	99

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- CA - Capsídeo
- CAE – Artrite-encefalite caprina
- CAEV – Vírus da artrite-encefalite caprina
- CV – Coeficiente de variação
- DB – *Dot-blot*
- DNA – Ácido desoxiribonucléico
- 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 Dáltons*
- LTR – *Long terminal repeat*
- LVPR – Lentivírus de pequenos ruminantes
- MA – Proteína da matriz
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- Mg – Magnésio
- MHC – Complexo maior de histocompatibilidade
- mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
- MSC – Membrana Sinovial Caprina
- MVV – Vírus Maedi-Visna
- NP - Nucleoproteína
- OIE – Organização Mundial da Saúde Animal
- OPPV – Vírus da pneumonia progressiva dos ovinos
- ORF – *Open reading frames*
- PBS – Solução salina fosfatada
- PCO – Plexo Coróide Ovino
- PCR – Reação em cadeia de polimerase

PEG - Polietilenoglicol

PNSCO – Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina

PNVCLVPR- Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose de Pequenos Ruminantes

PR - Protease

R – *Repeat*

RIA – Radioimunoensaio

RIPA – Radioimunoprecipitação

RNA – Ácido ribonucléico

RT – Transcriptase reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SRD – Sem raça definida

SU - Glicoproteína de superfície

TIGEF –Células fibroblásticas de embrião caprino imortalizadas

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*

ZP – Zona pelúcida

## RESUMO

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) lançou um Programa de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) que contempla um Plano Nacional de Vigilância e Controle das Lentivirose de Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR) onde está preconizado o uso da imunodifusão em gel de agar (IDGA) como teste de rotina no diagnóstico das lentivirose, sendo empregado, como prova confirmatória e para fins de certificação, o *western blot* (WB), embora este último não esteja disponível no país. Neste trabalho foi padronizado um WB para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos, utilizando antígeno através de um sistema simplificado de purificação, iniciado com a concentração por diálise do sobrenadante de culturas celulares de córnea infectadas e seguido de centrifugação em gradiente contínuo de sacarose. No WB, cinco proteínas virais foram reconhecidas pelo soro padrão positivo e apresentavam pesos moleculares de 14-16, 25, 40, 50 e 70 kDa. Ao se utilizarem amostras de campo de soro caprino positivas no *immunoblot*, pelo menos uma proteína viral foi reconhecida por todas as amostras. Todos os soros apresentavam anticorpos contra a proteína de 25 kDa. Reação positiva a gp40 foi observada em quatro animais, com intensidade de reação discreta em três deles. Dois animais apresentaram reação positiva à p16, e dois à gp50, embora pouco intensas. Foi ainda padronizado um ELISA utilizando proteína-G como conjugado, (ELISA-G), a partir de um ELISA indireto (ELISA-i). Os valores da relação positivo/negativo (P/N) obtidos para os soros padrão foi significativamente superior ( $P < 0,05$ ) no ELISA-G (10,9) do que no ELISA-i (4,8). Ao testar um grupo de 8 soros positivos e 10 negativos, observou-se, basicamente, o mesmo comportamento, com valores de P/N, no ELISA-G de 4,68 e no ELISA-i de 3,33, demonstrando maior capacidade de discriminação no caso do ELISA-G, o que é altamente desejável em padronização de ensaios imunoenzimáticos (EIE). Estes testes estão padronizados, porém o WB necessita ser mais amplamente avaliado e o ELISA requer validação (estimativa da sensibilidade e especificidade), com base no teste de um número significativo de amostras da população de caprinos e ovinos, representativas das diferentes condições epidemiológicas existentes no Brasil, para ser utilizado nos programas de controle de LVPR. Utilizando o WB, em adição a IDGA, foi realizada uma sorologia em animais nascidos por parto induzido, separados imediatamente após o nascimento de suas mães, e alimentados com colostro artificial ou tratado termicamente. Estas medidas, provavelmente, dificultariam a transmissão de LVPR das cabras positivas a seus descendentes, os quais apresentariam título baixo ou nulo de

anticorpos, porém os resultados dos dois testes revelaram que, embora sem alterações clínicas compatíveis com infecção por LVPR, 27,27% (12/44) dos animais anticorpos contra LVPR, concluindo-se que as medidas de manejo empregadas não foram suficientes para evitar a infecção pelos lentivírus; possivelmente, ocorreu infecção intrauterina, e/ou falha na inativação do vírus no colostro e leite, além da transmissão horizontal.

**Palavras-Chave:** CAEV, Maedi-Visna, diagnóstico, *western blot*, IDGA, ELISA, controle.

## ABSTRACT

In Brazil, the Agriculture Animal Husbandry and Supply Ministry (MAPA) has launched a Caprine and Ovine Health Program (PNSCO) which encompasses a National Plan of Control and Vigilance of Small Ruminants Lentiviruses (PNVCLVPR) that the usage of the agar gel immune-diffusion (AGID) is recommended as a routine test in the diagnosis of lentiviruses being used and the *western blot* (WB) as confirmatory test and for certification purposes, though the last is not available in the country. In this work a WB was standardized for the diagnosis of small ruminants lentiviruses (SRLV) in caprines, using antigen through a simplified purification system, initiated with the concentration by dialysis of the floating of infected corneas cell cultures and followed by centrifugation in continuous sucrose gradient. In the WB, five viral proteins were recognized by the standard positive serum, and showed molecular weights of 14-16, 25, 40, 50 and 70 kDa. When using field samples of caprine serum, also positive in the *immunoblot*, at least one viral protein was recognized by all the samples. All serums displayed antibodies against the 25 kDa protein. Positive reaction to gp40 was observed in four animals, with discreet reaction intensity in three of them. Two animals displayed positive reaction to p16, and two to gp50, although not intense ones. It was also standardized an ELISA using G protein as a conjugate, ELISA-G, from an indirect ELISA (ELISA-i). The values of the positive/negative relation (P/N) obtained for the standard serum was significantly superior ( $P < 0,05$ ) in the ELISA-G (10.9) than in the ELISA-i (4.8). When testing a group of 8 seropositive and 10 seronegative, it was observed, basically, the same behavior, with P/N values, in the ELISA-G of 4.68 and in the ELISA-i of 3.33, showing greater discrimination capacity regarding the ELISA-G, which is highly desirable in immune-enzymatic assays standardization (EEA). These tests are standardized, however the WB needs to be more widely evaluated and the ELISA requires validation (sensitivity and specificity estimate), based on the test of a significant number of samples of the caprine and ovine population, representative of different existent epidemiological conditions in Brazil, so that it can be used in the serological diagnosis of lentiviruses in SRLV control programs. Using the WB, in addition to AGID, a serology was performed in animals born through induced labor, separated immediately after birth from their mothers and fed with artificial or treated termally colostrum, these measures, probably, would difficult the transmission of LVSRLV from the infected goats to their descendents, that would show low or null title of antibodies, however the results of both tests revealed that, although without clinical alterations



compatible with infection by SRLV, 27.27% (12/44), all animals, showed antibodies against SRLV, concluding that the handling measures applied were not sufficient to avoid the infection by the SRLV, given that, possibly, an intrauterine infection, and/or failure to inactivate the virus in the colostrum and milk have occurred, besides horizontal transmission.

**Keywords:** CAEV, Maedi-Visna, diagnosis, *western blot*, IDGA, ELISA, control.

## INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade econômica explorada em todos os continentes, com expressão econômica em alguns países, sendo, na maioria dos casos, desenvolvida de forma empírica e extensiva, com baixa produtividade e reduzida rentabilidade.

No Brasil, o rebanho caprino representa 2,1% do efetivo mundial, estando a maior parte dos rebanhos na região Nordeste, com 8,9 milhões de cabeças. Os Estados da Bahia (3,5 milhões de cabeças), Pernambuco (1,5 milhão de cabeças) e Piauí (1,4 milhão de cabeças) se destacam pela criação de caprinos (IBGE, 2003). A análise da cadeia produtiva da caprinocultura tem apontado para um grande potencial de expansão da atividade, dependente de ações que permitam a disponibilidade de produtos de melhor qualidade, com maior valor agregado. Entretanto, à medida que se aumenta o incentivo para ampliação desta atividade, através do melhoramento genético de caprinos sem raça definida (SRD), aumentam-se o risco de transmissão de enfermidades, sobretudo as lentiviroses de pequenos ruminantes. Nestas espécies é fundamental o controle sanitário dos animais envolvidos nos programas de melhoramento genético (CASTRO e MELO, 2001). Em Pernambuco a prevalência de LVPR é alta em rebanhos caprinos leiteiros (17,6%) (SARAIVA NETO et al., 1995), e baixa (3,72%) ou nula em caprinos mestiços ou SRD (OLIVEIRA et al., 2006).

Os Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) são agrupados em cinco grupos filogenético, dos quais os dois principais estão representados pelos protótipos vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus de Maedi-Visna (MVV) (SHAH et al., 2004). Estes vírus causam grandes prejuízos econômicos por aumentar os problemas reprodutivos em fêmeas múltiparas, diminuir a produção leiteira e o período de lactação e diminuir o peso dos cabritos ao nascimento até o desmame, principalmente em criações dedicadas a produção leiteira (GREENWOOD, 1995a), sendo necessário controlar os LVPR através da eliminação dos animais soropositivos.

Uma das características da infecção por LVPR é freqüente a existência de animais soropositivos sem apresentação de sinais clínicos, por isso, a sorologia é o meio mais adequado para identificação destes animais. Vários testes sorológicos podem ser aplicados para o diagnóstico de LVPR, tais como a imunodifusão em gel de agar (IDGA), ELISA, o *dot-blot* (DB) e o *western blot* (WB) (ANDRÉS et al., 2005).

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) preconiza para o diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes o uso da imunodifusão em gel de agar (IDGA) e do ELISA. No Brasil, o Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose de Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR), que integra o Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2004a; BRASIL 2004 b), preconiza o uso da imunodifusão em gel de agar (IDGA) como teste diagnóstico para LVPR, e o *western blot* (WB) como prova confirmatória e para fins de certificação de propriedades livres, que deverá ser realizada em laboratório oficial, em casos duvidosos. Embora preconizado pelo MAPA, este teste ainda não está disponível no país.

A IDGA é um teste específico, fácil e barato de ser executado, não necessitando de uma estrutura laboratorial sofisticada, tendo como principal desvantagem, a baixa sensibilidade. O ELISA indireto (ELISA-i) é mais sensível do que a IDGA, porém apresentam outras desvantagens, como o risco de ocorrência de resultados falso-positivos e a necessidade da utilização de antígenos mais puros do que os empregados na IDGA. As reações falso-positivas podem ser reduzidas pelo uso de conjugado proteína-G, pois se sabe que esta proteína se liga com elevada afinidade à IgG de ovinos e caprinos (AKERSTROM et al., 1985). O WB tem sido utilizado comumente como padrão ouro (*gold standard*) em padronizações e validações de testes de ELISA para diagnóstico de LVPR em ovinos (ZANONI et al., 1989) e também como ferramenta na análise da resposta imunológica de ovinos natural e experimentalmente infectados com Maedi-Visna (HOUWERS e NAUTA, 1989; KAJIKAWA et al., 1990); porém relatos sobre sua aplicação em amostras caprina são escassos (ROSATI et al., 1995).

Quanto ao antígeno, muitos protocolos para sua produção e purificação com fins diagnósticos têm sido estabelecidos. Estes empregam, de forma simples ou combinada, as seguintes técnicas: centrifugação simples, centrifugação e ultracentrifugação em gradiente contínuo ou descontínuo de sacarose, filtração pressurizada, cromatografias de troca-iônica e de afinidade, concentração e precipitação com polietilenoglicol 8.000 (PEG 8.000) (SIMARD et al., 2001; ZANONI et al., 1994; SIMARD e BRISCOE, 1990a; SIMARD e BRISCOE, 1990b; ARCHAMBAULT et al., 1988; HOUWERS et al., 1982). A maioria destes protocolos é laboriosa e demorada, pois contempla várias etapas de processamento, requerendo uma estrutura laboratorial sofisticada.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver e padronizar um *western blot* e um ELISA-G para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos, e avaliar a eficiência das medidas de manejo empregadas a animais submetidos a um programa de controle para LVPR por meio da sorologia.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência das células de córnea na replicação do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV)
- Desenvolver um *western blot* para diagnóstico de LVPR em caprinos a partir da obtenção de antígeno produzido em cultura celular epitelial de córnea, infectadas com o vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV), purificado utilizando precipitação com polietilenoglicol (PEG) 8.000 e centrifugação em gradiente contínuo de sacarose;
- Padronizar ELISA utilizando como conjugado a proteína-G (ELISA-G) para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos;
- Avaliar a eficiência das medidas de manejo empregadas a animais submetidos a um programa de controle para LVPR por meio da sorologia.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

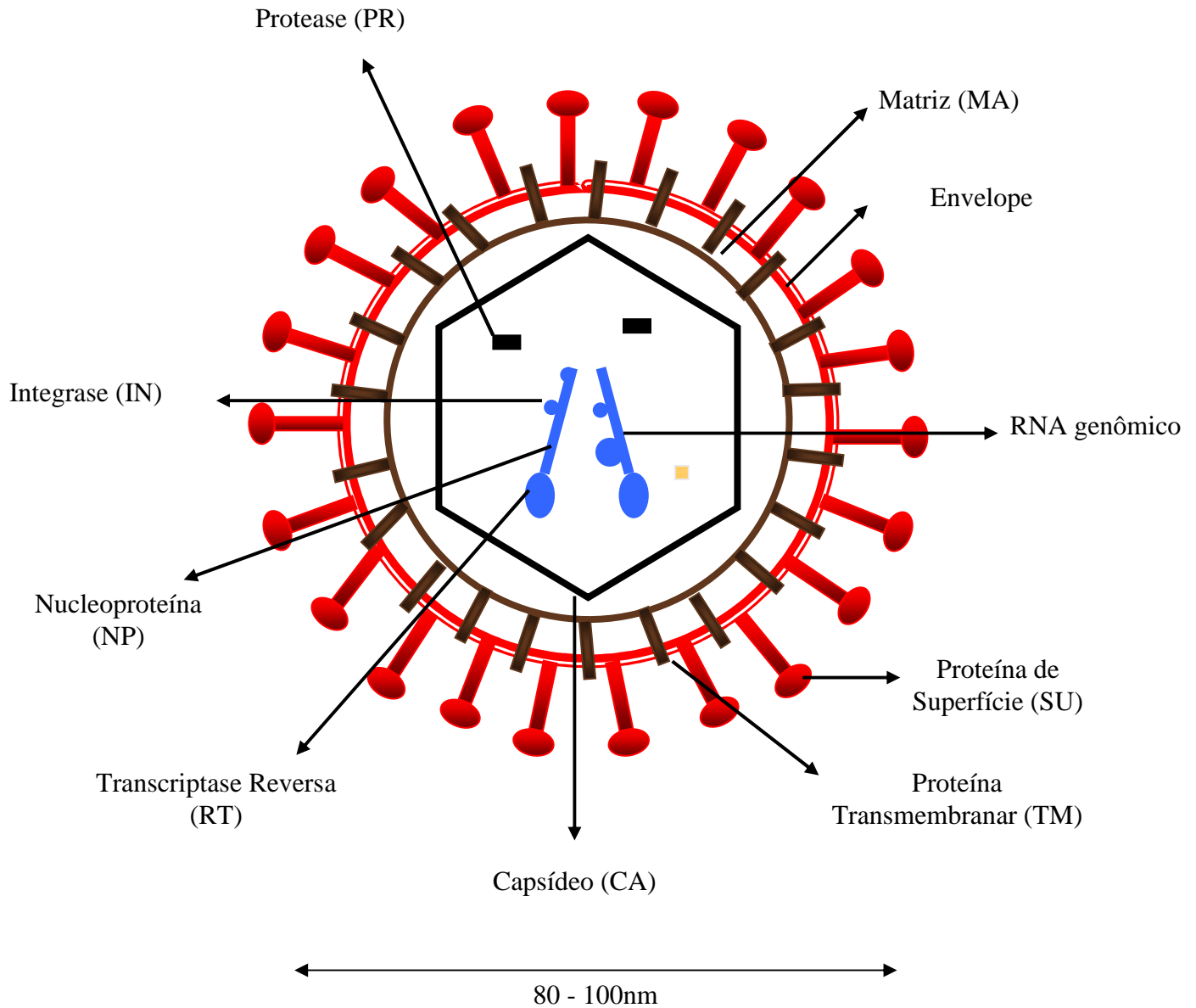
#### 3.1 LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)

##### 3.1.1 Classificação, estrutura e replicação

Os LVPR são agrupados em cinco grupos filogenético, dos quais os dois principais estão representados pelos protótipos vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus de Maedi-Visna (MVV) (SHAH et al, 2004).

As partículas virais são esféricas, envelopadas e apresentam diâmetro variando entre 80-100nm. Seu envelope externo é fosfolipídico contendo também as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranar (TM). As principais proteínas internas são a da matriz (MA), do capsídeo (CA) e a nucleoproteína (NP), que está associada ao RNA genômico. Existem ainda as proteínas com propriedades enzimáticas, como a transcriptase reversa (RT), a protease (PR) e a integrase (IN) (Figura 1) (COFFIN, 1996).

O envelope viral apresenta em sua composição muitos carboidratos, a exemplo do ácido siálico, que são importantes para a sobrevivência viral. Estes protegem as proteínas virais da digestão por proteases, como exemplo das enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, o que facilita a infecção das células intestinais, e também promovem uma resistência do vírus a uma rápida neutralização por anticorpos, o que facilita seu escape do controle humoral aumentando a persistência do vírus (HUSO et al., 1988). Seu genoma consiste de duas moléculas idênticas de RNA dependente da transcriptase reversa que por sua vez é dependente de magnésio ( $Mg^{2+}$ ). Em suas extremidades 3' e 5' estão presentes duas curtas seqüências idênticas denominadas *repeat* (R), com a mesma orientação, e uma seqüência em cada extremidade, denominada *unique 5* (U5) e *unique* (U3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral. Depois da retrotranscrição, o DNA proviral resultante apresenta duas regiões terminais não codificantes (*long terminal repeat* – LTR). Estas LTR seriam as responsáveis pelo tropismo dos LVPR para alguns tipos celulares (AGNARDÖTTIR et al., 2000). Entre essas regiões extremas estão localizados os genes que codificam proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), e reguladoras da expressão viral (*tat*, *rev* e *vif*) (Figura 2) (CLEMETS e PAYNE, 1994).



**Figura 1** – Estrutura das partículas virais, apresentando a localização das principais proteínas: transcriptase reversa (RT), capsídeo (CA), transmembranar (TM), proteína de superfície (SU) e nucleoproteína (adaptado de COFFIN, 1996).

O gene *gag* codifica um precursor de 50-57 kDa que é clivado nas três proteínas mais abundantes do vírus e que estimulam uma forte resposta humoral durante a infecção: as proteínas de matriz com 15-17 kDa (MA), as proteínas de capsídeo com 24-28 kDa (CA) e a nucleoproteína de capsídeo com 14 kDa (NP). Trabalhos tem demonstrado que um precursor de *gag* de 55 kDa (Pr55<sub>gag</sub>) é o responsável pela montagem e brotamento de partículas virais em estruturas membranares (HAZIZA et al., 2001). O gene *pol* codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa (RT), protease (PR), integrase (IN), e a dUTPase. O *env* codifica o precursor das glicoproteínas do envelope: a glicoproteína de superfície de 135 kDa(SU) e a glicoproteína transmembranar de 44-50 kDa (TM). Os genes *tat* e *rev* codificam as proteínas reguladoras da expressão viral Tat e Rev, respectivamente, o gene *vif* é classificado como gene acessório e codifica a proteína Vif (JOAG et al., 1996). A função dos gene *tat* e *vif* vem sendo investigada e algumas hipóteses foram levantadas sobre a participação de gene *tat* na ativação de macrófagos infectados, o que levaria a um aumento da expressão viral, e aumentaria a reatividade dos anticorpos e dos linfócitos nos tecidos infectados (HARMACHE et al., 1995a; HARMACHE et al., 1998). Em relação ao gene *vif*, este é requerido para uma eficiente replicação viral “*in vitro*” e “*in vivo*” sendo importante também para sua patogenicidade (HARMACHE et al., 1995b, HARMACHE et al., 1996a; HARMACHE et al., 1996b).

Os LVPR são genética e antígenicamente relacionados pela homologia que existe entre os genes *gag* e *pol* (Figura 2), porém são biologicamente distintos: um grupo apresenta elevado poder citolítico *high-litic* (MVV) e o outro possui replicação lenta causando infecção persistente *slow/low* (CAEV) (JOLLY e NARAYAN, 1989). As mutações que ocorrem estão mais relacionadas ao gene *env* e às ORF's das proteínas regulatórias e estas podem alterar as propriedades biológicas e de reconhecimento sorológico dos vírus (LEROUX et al., 1996).

Em relação ao seu ciclo de replicação, os lentivírus podem exibir dois padrões de montagem de suas partículas. No primeiro padrão, denominado tipo B/D, as partículas virais imaturas são montadas no citoplasma, recebendo o nome de partículas intracitoplasmáticas do tipo A (ICAP), seu envelope surge pelo brotamento da membrana plasmática; neste grupo encontram-se os lentivírus que acometem camundongos e macacos. O outro padrão, denominado tipo C, a montagem e o brotamento das partículas virais se dão na membrana plasmática; neste grupo são enquadrados os LVPR (HAZIZA et al., 2001).

O ciclo de replicação do vírus (Figura 3) inicia-se pela adsorção da partícula à superfície celular. Nas células de membrana sinovial caprina (MSC) e nas de plexo coróide ovino (PCO) foram identificados como receptores para Maedi-Visna, três proteínas expressas em suas superfícies (15, 30 e 50 kDa) (LEROUX et al., 1995a), e também polipeptídeos do complexo maior de histocompatibilidade da classe II (MHC-II) (DALZIEL et al., 1991).

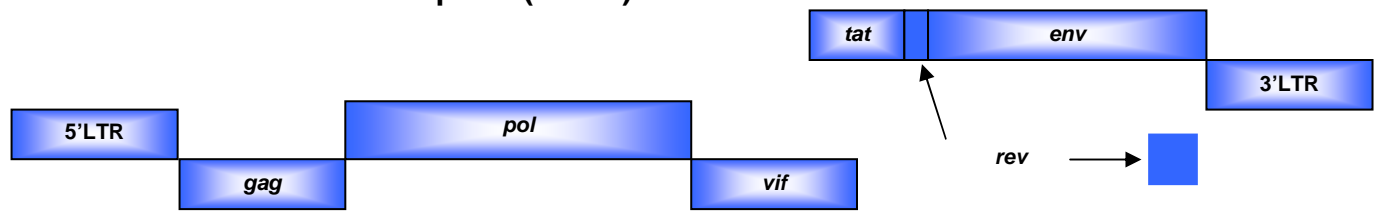
Após fusão com a membrana celular e destruição parcial do capsídeo ocorre a retrotranscrição, sob ação da RT, que sintetiza uma cópia de DNA bicatenário a partir do RNA viral, iniciada por tRNA celular (SONIGO et al., 1985). Durante as etapas de síntese do DNA as sequências U3 e U5 são duplicadas e orientadas 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. A integração, que ocorre com apenas poucas moléculas de DNA sintetizadas, não é essencial à replicação dos lentivírus, mas é fundamental para persistência da infecção (HAASE, 1986).

A transcrição do DNA proviral em RNA genômico ou mRNAs subgenômicos pela ação da enzima celular RNA polimerase II ocorre em uma etapa precoce caracterizada pela presença, principalmente no citoplasma, de pequenos mRNAs virais, responsáveis pela produção das proteínas regulatórias (Tat e Rev), e outra tardia, durante a qual ocorre intensa transcrição, resultando no surgimento de pequenos e de grandes mRNAs, com síntese das proteínas estruturais (Gag e Env), e das enzimas virais (Pol) e da última proteína de regulação (Vif) (VIGNE et al., 1987; SARGAN et al., 1994).

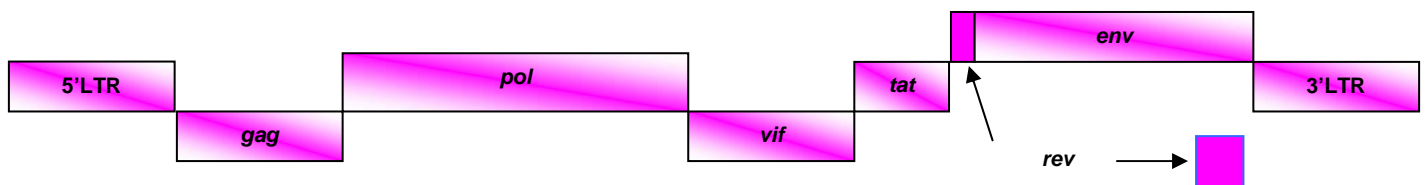
As etapas finais do ciclo de replicação dos LVPR não são bem estudadas. De forma geral, a tradução dos mRNAs dos lentivírus é feita por mecanismos celulares e resultam na produção de polipeptídeos precursores, que são clivados por enzimas proteolíticas dando origem às proteínas virais. Os mRNAs codificantes para env são traduzidos nos polirribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso e o produto fica ancorado na membrana celular, enquanto que os RNA completos são traduzidos em precursores *gag* ou *gag-pol* nos polirribossomos livres. Em seguida à síntese dos componentes virais ocorre a montagem, fenômeno controlado pelo precursor *gag*, com encapsidação de duas moléculas de RNA genômico, a tRNA *primer* e a RT, processamento proteolítico dos polipeptídeos precursores e o brotamento das partículas virais, que adquirem componentes lipídicos da membrana celular para composição do envelope viral (CLEMENTS e PAYNE, 1994; COFFIN, 1996).



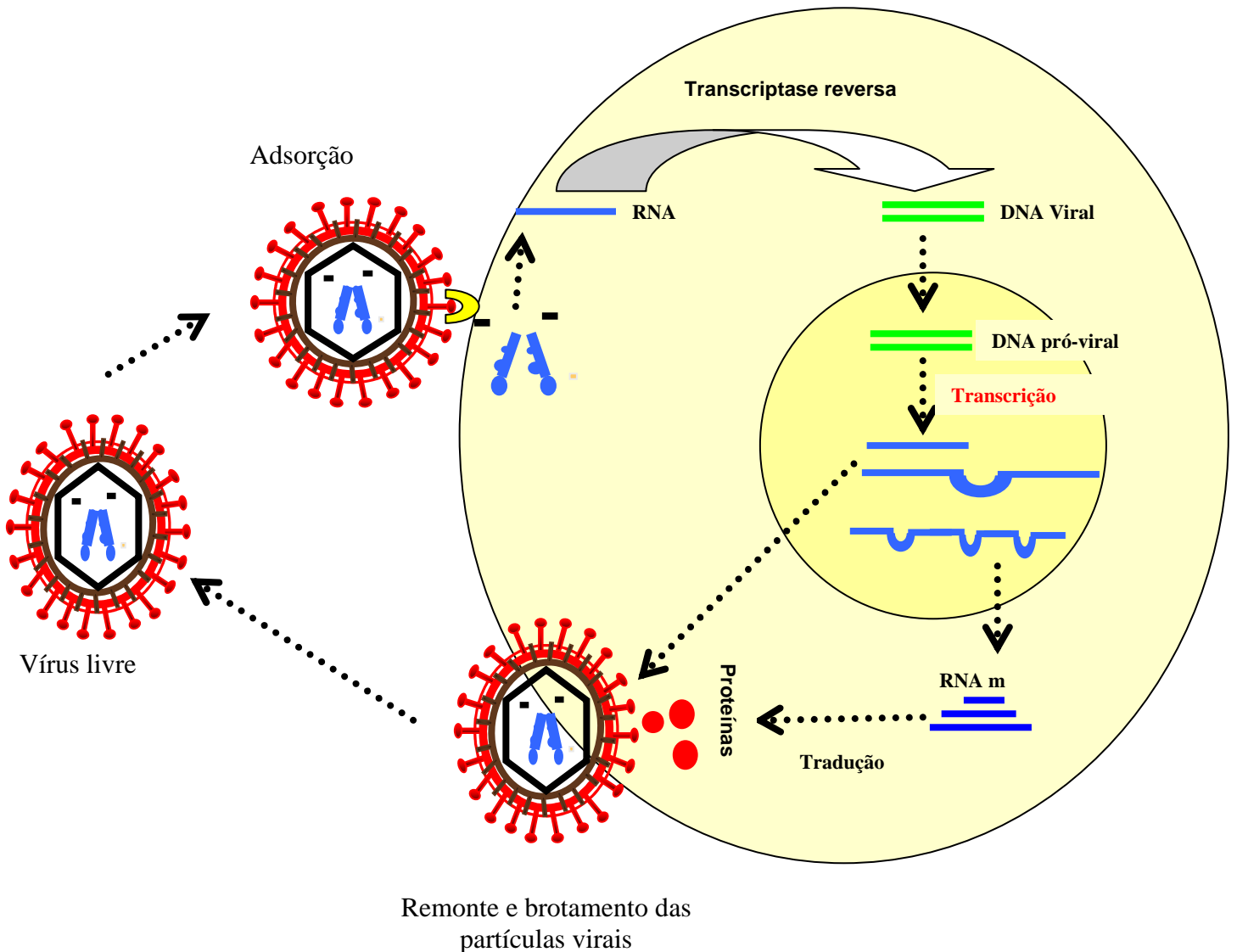
### Vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV)



### Vírus Maedi-Visna (MVV)



**Figura 2** – Estrutura do DNA-proviral do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e do vírus Maedi-Visna (MVV) (CLEMENTES e PAYNE, 1994).



**FIGURA 3** - Ciclo de replicação dos retrovírus demonstrando as etapas desde a adsorção da partícula viral à célula hospedeira até o remonte e brotamento de novas partículas virais (adaptado de COFFIN, 1996).

### 3.1.2 Infecção *in vivo* e *in vitro*

A infecção viral clássica consiste em três fases de interação entre o vírus e as células hospedeiras (JOAG et al., 1996):

1. Disseminação do agente para as células alvo seguida da infecção do hospedeiro;
2. Replicação viral nas células alvo;
3. Eliminação do vírus, onde ocorre um declínio na taxa de replicação viral associado com a mobilização dos mecanismos de defesa específicos e inespecíficos do hospedeiro.

Os LVPR “*in vivo*” apresentam tropismo pelas células da linhagem monócito-fagocitárias (NARAYAN et al., 1982; NARAYAN et al., 1983), principalmente os macrófagos, tanto em animais sintomáticos quanto nos assintomáticos (STORSET et al., 1997). Porém o vírus já foi isolado de outras células e órgãos como: as células de membrana sinovial caprina (MSC) (CHUNG e O’SULLIVAN, 1981) e dos pulmões (CUTLIP e LAIRD, 1976). Neste órgão, as células que podem ser reservatórios para os LVPR são os macrófagos alveolares e intersticiais, pneumócitos do tipo I e II, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos (CARROZA et al., 2003). Sua presença também tem sido relatada na terceira pálpebra (CARPUCCHIO et al., 2003), células epiteliais das criptas intestinais, dos túbulos renais, da tireóide (ZINK et al., 1990), do trato genital feminino (útero e oviductos) e em células epiteliais mamárias, o que sugere que estas células sejam um potencial reservatório e fonte de infecção para a transmissão vertical de LVPR para embriões e fetos (FIENI et al., 2003; BOLEA et al., 2006). Monócitos contendo LVPR estão presentes intermitentemente na circulação de animais infectados, porém nas fêmeas, provavelmente por influência hormonal, ocorrem períodos alternados de expressão viral reduzida e um grande número de monócitos infectados circulantes, principalmente no final da gestação e início da lactação (MILHAU et al., 2005).

A soroconversão dos animais infectados pode ocorrer em um intervalo de semanas, meses ou até mesmo anos, podendo ocorrer períodos de sororeversão (HANSON et al., 1996). A primeira resposta imune é detectada em torno da terceira semana após a infecção, sendo principalmente dirigida contra a proteína do capsídeo (p25 ou p28) e estes anticorpos persistem (HOUWERS e NAUTA, 1989); por volta da quinta semana são produzidos anticorpos contra as demais proteínas: nucleoproteína (NP), da matriz (p17), transmembranar (gp44) e de superfície (gp135) (DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al., 1995). FEVEREIRO et al. (1999) afirmam que

os anticorpos contra as proteínas de envelope (anti-gp135) estão presentes em títulos mais elevados do que os contra proteínas nucleares (anti-p25 ou anti-p28), e que todos os animais que apresentam anticorpos contra p25 apresentam anticorpos anti-gp-135, porém àqueles que apresentam anticorpos anti-gp135 nem sempre possuem anti-p25.

Os animais infectados desenvolvem imunoglobulinas da classe G (IgG) do tipo 1 e 2. TRUJILLO et al. (2004) demonstraram que animais infectados cronicamente e que desenvolvem artrite têm predominantemente IgG do tipo 1 dirigidos contra as glicoproteínas de envelope (gp135), enquanto que as IgG do tipo 2 estão presentes, de forma predominante, nos animais com ausência de alterações patológicas nas articulações.

Os LVPR apresentam algumas características interessantes como à persistência da infecção, mesmo na presença de uma resposta imunológica, devido à restrição da replicação viral (GENDELMAN et al., 1986) e da capacidade de mutações, resultando na formação de subpopulações virais heterogêneas denominadas *quasispécie* (PASICK, 1998a).

“*In vitro*”, os LVPR podem se replicar em vários tipos celulares (Tabela 1), tais como as células musculares lisas (LEROUX et al., 1995a), células epiteliais de oviducto (LAMARA et al., 2002a), células endoteliais (LECHAT et al., 2005), células epiteliais da glândula mamária (MILHAU et al., 2005), células epiteliais de córnea de feto caprino (HECKERT et al., 1992; SIMARD et al., 2001). No entanto, a principal célula utilizada “*in vitro*” para replicação destes vírus são as de membrana sinovial (MS) (CRAWFORD et al., 1980); segundo ABREU et al. (1998) estas células replicam CAEV satisfatoriamente, tanto em células de baixa passagem (5<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup>) como de alta (17<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup>), produzindo efeito citopático (ECP) típico caracterizado por vacuolização e formação de sincícios, seguido de morte celular. A formação destes sincícios parece ser resultado da ligação do vírus à célula e que ocorre graças a interações das glicoproteínas de envelope (SU) virais e receptores específicos das células. Na superfície das células de membrana sinovial caprina (MSC) e plexo coróide ovino são expressas três proteínas (15, 30 e 50 kDa) que foram identificadas como receptores para Maedi-Visna (LEROUX et al., 1995a).

Células de linhagem também vêm sendo usadas para replicação dos LVPR. As células fibroblásticas de embrião caprino imortalizadas-T (TIGEF) e as de MS imortalizadas com telomerase humana apresentam boa permissividade a ambos LVPR, suportando um ciclo

completo de replicação viral, sobretudo entre a 60<sup>a</sup> e 120<sup>a</sup> passagem (TEIXEIRA et al., 1997; ROLLAND et al., 2004).

**Tabela 1** - Células envolvidas na replicação “*in vitro*” dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

Tipos celulares	Referências
Células fibroblásticas do plexo coróide	TERPSTRA e DE BOER (1973); WINWARD et al. (1979); DAWSON et al. (1979); DAWSON et al. (1982); HOUWERS et al. (1982); HOUWERS e NAUTA (1989); JOLLY e NARAYAN (1989); TORFASON et al. (1992); ROSATI et al. (1994); KEEN et al. (1995); CHEBLOUNE et al. (1996); FEVEREIRO et al. (1999); SKRABAN et al. (1999); CELER et al. (1998); CELER et al. (2000); CELER e CELER (2001); SIMARD e BRISCOE (1990a); SIMARD e BRISCOE (1990b); KRISTBJÖRNSDÓTTIR et al. (2004); ELTHAIR et al. (2006)
Células epiteliais do leite	LERONDELLE et al. (1999); MSELLI-LAKHAL et al. (1999)
Células epiteliais mamárias	ZANONI et al. (1994); LERONDELLE et al. (1999)
Células epiteliais do oviducto	LAMARA et al. (2002a)
Células da granulosa	LAMARA et al. (2001)
Células endoteliais ovinas	LE JAN et al. (2000)
Células do <i>cumullus oophurus</i>	CORTEZ ROMERO et al. (2006)
Células de córnea	HECKERT et al. (1992); SIMARD et al. (2001)
Células de traquéia	DAWSON et al. (1982)
Células pulmonares	CUTLIP e LAIRD (1976); WINWARD et al. (1979); KONISHI et al. (2004)

**Tabela 1(cont.)** - Células envolvidas na replicação “*in vitro*” dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

Tipos celularer	Referências
Células musculares lisas	LEUROX et al. (1995a); LECHAT et al. (2005)
Condrócitos	SAMAN et al. (1999)
Embriões sem zona pelúcida (ZP)	LAMARA et al. (2002b); ALI AL AHMAD et al. (2006)
Fibroblastos caprinos imortalizados	TEIXEIRA et al. (1997); MSELLI-LAKHAL et al. (1998); MSELLI-LAKHAL et al. (2000)
Fibroblastos ovinos	LEROUX et al. (1995b); SAMAN et al. (1999)
Macrófagos	JOLLY e NARAYAN (1989); LÚJAN et al. (1994); ZHANG et al. (2000)
Membrana sinovial	NARAYAN et al. (1980); CRAWFORD e ADAMS (1981); KLEVJER-ANDERSON e CHEEVERS (1981); QUÉRAT et al. (1984); SCHROEDER et al. (1985); ADAMS e GORHAM (1986); BLONDIN et al. (1989); JOLLY e NARAYAN (1989); KNOWLES et al. (1994); DAVIES et al. (1997); MSELLI-LAKHAL et al. (1998); SIMARD e BRISCOE (1990a); SIMARD e BRISCOE (1990b); SIMARD et al. (2001); HAZIZA et al. (2001); CHEEVERS et al. (2003); ROLLAND et al. (2004); KRISTBJÖRNSDÓTTIR et al. (2004); ALI AL AHMAD et al. (2006)

## 3.2 LENTIVIROSES DE PEQUENOS RUMINANTES

### 3.2.1 Aspectos clínicos e anatomohistopatológicos

Aproximadamente 25% dos caprinos e ovinos infectados com LVPR podem desenvolver artrite, sobretudo da articulação carpo-metacarpiana, encefalomielite, emagrecimento, mastite e complicações respiratórias, como pneumonia (NARAYAN et al., 1980; CRAWFORD e ADAMS, 1981).

As lesões inflamatórias encontradas nas articulações são resultantes das interações entre a resposta imune do hospedeiro, que é dirigida principalmente a gp135, e o antígeno viral (CHEEVERS et al., 1988; BRODIE et al., 1992; TRUJILLO et al., 2004; RAVAZZOLO et al., 2006). CHEEVERS et al. (2003) afirmam que os animais infectados não desenvolvem artrite de maneira uniforme e que o *status* da doença está associado com o tipo da resposta imune do hospedeiro as proteínas virais. Animais que apresentam infecção persistente não progressiva apresentam baixos títulos virais e de anticorpos, ativam os linfócitos Thelper1, que são responsáveis pela restrição da replicação viral e desenvolvimento da doença clínica. Nos animais com artrite, a carga viral é maior, o título de anticorpos é alto tanto no soro quanto no fluido sinovial e os linfócitos ativos são Thelper2, que são os responsáveis em promover artrite progressiva imunomediada (TRUJILLO et al., 2004).

A artrite acomete, na maioria das vezes, animais adultos, de um a dois anos de idade, e é caracterizada pelo aparecimento de higromas e de graus variados de claudicação, principalmente na articulação cárpica. Microscopicamente, essas lesões são caracterizadas por hipertrofia das vilosidades das membranas, seguindo-se de alterações degenerativas com necrose e perda de vascularização, com infiltração de células mononucleares (ADAMS et al., 1980). MCGUIRE et al. (1992) citam que animais com artrite progressiva têm altos títulos de anticorpos para proteínas oligoméricas (gp90) e monoméricas (gp38).

A encefalite é observada, geralmente, em caprinos e ovinos jovens, com idade variando de dois a quatro meses, sendo caracterizada por ataxia que pode progredir a paresia ou paralisia, tremores, opistótono e torcicolo com movimentos de pedalagem (CORK et al., 1974). As lesões necroscópicas observadas são meningo-encefalomielite, desmielinização (CORK e NARAYAN, 1980), mielite (BENAVIDES et al., 2006) e presença de infiltrado mononuclear perivascular (CONSTABLE et al., 1996).



A severidade da pneumonia causada por LVPR, mais importante para os ovinos, está correlacionada com a carga viral presente nos macrófagos alveolares (ZINK et al., 1990; ZHANG et al., 2000). Os sintomas são tosse, dispnéia, taquipnéia e a ausculta ouve-se crepitações. Ao exame anatomo-histopatológico podem ser observadas áreas de linfoproliferação nos pulmões e linfonodos (CUTLIP et al., 1979). A carga viral é maior em macrófagos alveolares do que em monócitos sanguíneos, e que estes macrófagos têm papel fundamental na patogênese da pneumonia intersticial (ZHANG et al., 2000).

A mastite nos caprinos é caracterizada macroscopicamente pelo endurecimento do úbere e agalaxia, provocando uma redução média na produção leiteira de 88kg de leite/lactação, embora o aspecto do leite não seja alterada, ficando diminuído também, em 21 dias, o período de lactação (SMITH e CUTLIP, 1988; GREENWOOD, 1995a). Microscopicamente, as lesões consistem em hiperplasia linfóide folicular ao redor dos ductos lactíferos, infiltração intersticial de células mononucleares e fibrose (LERONDELLE et al., 1999).

Em casos de mastite subclínica os animais positivos para LVPR possuem 3,4 vezes mais chances de apresentarem um quadro com maior severidade do que animais não infectados. Esta associação entre mastite subclínica, crônica e a positividade para LVPR pode ter duas explicações biológicas: o próprio LVPR causa mastite clínica fibrosante e/ou este aumento no caso das mastites subclínicas pode ser explicado pela susceptibilidade do hospedeiro a outros agentes patogênicos mamários como as bactérias e os fungos (KEEN et al., 1996). Existem relatos de associação de positividade de animais para LVPR e ocorrência de mastite por *Staphylococcus* sp variedade não hemolítica (SMITH e CUTLIP, 1988).

A infecção por LVPR pode acarretar muitos prejuízos econômicos tais como: a diminuição em até 0,3kg de peso da cria ao nascer e de 6kg no peso das crias até 120 dias, além do aumento em 25% nos distúrbios reprodutivos de cabras multíparas (SMITH e CUTLIP, 1988; GREENWOOD, 1995a; KEEN et al., 1996).

### **3.2.2 Formas de transmissão**

O reservatório e a fonte de infecção de LVPR são os animais infectados que transmitem o agente por meio de secreções ou excreções ricas em células contaminadas (ADAMS et al., 1983).

A transmissão vertical, que é favorecida pela permeabilidade intestinal dos animais recém-nascidos (HOUWERS e VAN DER MOLEN, 1987) ocorre pela ingestão do colostro e

leite contaminados (ADAMS et al., 1983; ELLIS et al., 1986; WATT et al., 1994; GREENWOOD, 1995b; de la CONCHA-BERMEJILLO, 1997; ÁLVAREZ et al., 2006). BOLEA et al. (2006) demonstraram a infecção “*in vivo*” de células epiteliais mamárias em fêmeas infectadas com MVV, reforçando o papel do leite como uma importante fonte de infecção para animais recém-nascidos.

Quanto à transmissão intrauterina, BRODIE et al. (1994) afirmam que este tipo de transmissão pode ocorrer em aproximadamente 10% dos animais nascidos de fêmeas infectadas; esta hipótese vem sendo reforçada por FIENI et al. (2003), LAMARA et al. (2002a) e LAMARA et al. (2001) que demonstraram a presença de células infectadas por LVPR no trato genital das fêmeas (útero e oviducto) como uma importante fonte de contaminação para embriões e fetos, e por ÁLVAREZ et al. (2006), que detectaram com auxílio de um PCR-LTR infecção em cordeiros recém-nascidos de mães positivas.

A transmissão horizontal ocorre de animal a animal, sendo necessário contato íntimo e prolongado entre os mesmos. Nestes casos a alta densidade populacional é um fator favorável à transmissão que pode ocorrer através das fezes, saliva, secreção respiratória, alimentos e água contaminados, por objetos contaminados (agulhas, seringas, instrumento cirúrgico, tatuador, ferramentas em geral e ordenhadeiras mecânicas), e até mesmo pelas pessoas que os manejam (ADAMS et al., 1983; DeMAAR et al., 1995; GREENWOOD, 1995b; ÁLVAREZ et al., 2005; PISONI et al., 2005).

Embora o DNA pró-viral de lentivírus caprino e partículas virais livres infecciosas foram detectadas no sêmen de machos naturalmente infectados com CAEV (TRAVASSOS et al., 1998; ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al. 1999), a transmissão venérea precisa ser melhor estudada (PETERHANS et al., 2004).

### **3.2.3 Controle e profilaxia**

Não existe tratamento para LVPR e a imunoprofilaxia não é praticada por não existirem vacinas eficazes. Vacinas vivas recombinantes baseadas na glicoproteína de superfície (gp135) (KEMP et al., 2000), vacinas de DNA expressando gene *env* sozinhos ou somados a gp135 (GONZÁLEZ et al., 2005; CHEEVERS et al., 2003) e vacinas vivas atenuadas com deleção do gene *vif* ou gene *tat* (HARMACHE et al., 1996b) vem sendo produzidas e testadas. Os resultados obtidos em estudos de campo utilizando estas vacinas apontam sua utilização como auxiliar na

restrição da replicação viral, e da progressão da doença, mas não um efeito protetor contra a infecção.

Muitas estratégias para controle dos LVPR têm sido descritas, e a maioria está baseada no teste e descarte dos animais positivos. PETERHANS et al. (2004) sugerem que uma boa estratégia seria determinar inicialmente a prevalência de LVPR no rebanho, em seguida reduzir o *status* de rebanho com alta prevalência para baixa prevalência, depois o *status* de baixa prevalência passaria para *status* sorologicamente negativo erradicando a doença neste ponto e, por último consolidar o *status* de rebanho sorologicamente negativo e desta forma erradicar o vírus no rebanho. Para se alcançar este *status* algumas medidas de manejo devem ser adotadas, tais como:

1. Realização de testes sorológicos de triagem em animais com mais de 12 meses (SIHVONEN et al., 2000; PETERHANS et al., 2004). CASTRO et al. (2002) sugere que em casos de programa de controle seja dada ênfase ao teste das fêmeas no início de sua vida reprodutiva;
2. Separação dos animais de suas mães ao nascer (ELLIS et al., 1986; NORD et al., 1998; TURIN et al., 2005);
3. Alimentação dos recém-nascidos inicialmente com colostro de vaca ou colostro de cabras negativas ou colostro de cabra pasteurizado; depois com leite de cabra pasteurizado ou leite de vaca (GREENWOOD et al., 1995b; HANSON et al., 1996; NORD et al., 1998);
4. Isolamento e/ou abate de animais infectados; abate de animais com sintomatologia clínica (GREENWOOD et al., 1995b; TURIN et al., 2005);
5. Manutenção do rebanho fechado, com aquisição de animais apenas de criações com certificação negativa.

O descarte de animais é um ponto limitante na estratégia de controle para LVPR, pois os produtores não querem arcar com o prejuízo de perder o animal, que algumas vezes apresenta elevado padrão zootécnico. É necessário lembrar, porém, que os animais infectados mantidos em um rebanho favorecem a manutenção da infecção e o aumento no surgimento de alterações clínicas (CASTRO et al., 2002).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou um Programa de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) (BRASIL, 2004a) que contempla um Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose de Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR)

(BRASIL, 2004b) onde são apresentadas propostas que visam diminuir o impacto dos principais fatores de risco para disseminação das lentivirose nos rebanhos caprino e ovino. Este plano engloba a adoção de medidas de biossegurança, tais como as medidas de manejo descritas anteriormente e o diagnóstico das lentivirose, como ferramentas para o controle das LVPR. O diagnóstico de rotina preconizado é a imunodifusão em gel de agar (IDGA), devendo ser realizado o *western blot* (WB) em casos duvidosos ou para certificação.

### 3.2.4 Diagnóstico

Para o controle de LVPR, o diagnóstico é uma ferramenta de suma importância, uma vez que as decisões em relação ao rebanho serão tomadas com base em seus resultados. Por isso, é necessário que se tenha um teste de alta sensibilidade e especificidade. O diagnóstico pode ser realizado por muitos testes, tanto diretos quanto indiretos (sorológicos), que podem ser divididos em duas categorias (ANDRÉS et al., 2005):

1. Testes de triagem:
  - a. Imunodifusão em gel de agar (IDGA);
  - b. ELISA.
2. Testes complementares:
  - a. Radioimunoprecipitação (RIPA) ou imunoprecipitação;
  - b. Radioimunoensaio (RIA);
  - c. *Western blot* (WB);
  - d. Reação em cadeia de polimerase (PCR), sendo este um método direto.

A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza o uso dos testes sorológicos IDGA e ELISA para diagnóstico de LVPR (OIE, 2006).

#### 3.2.4.1 Métodos Indiretos

No Brasil, o PNVCLVPR preconiza como diagnóstico de rotina a IDGA, devendo ser realizado o WB e a PCR, em casos duvidosos ou para certificação.

O teste de IDGA é eficiente para CAEV e Maedi-Visna, devido à semelhança antigênica que estes possuem (CRAWFORD et al., 1980). É um teste de fácil execução e leitura, exigindo poucos equipamentos; apresenta alta especificidade e sensibilidade variada, dependendo do tipo de antígeno usado.

Quando se utiliza como antígeno a glicoproteína de superfície gp135, a sensibilidade do teste é maior do que quando se trabalha com a proteína interna p28 ou p25 de CAEV ou de MVV. Esta sensibilidade pode ser melhorada quando se utiliza simultaneamente a proteína p28/p25 e gp135 de CAEV (ADAMS e GORHAM, 1986). Por outro lado, tem sido observado que a utilização da p28 de CAEV torna o teste mais sensível do que quando se utiliza a proteína p25 do vírus MVV (ABREU et al., 1998). KNOWLES et al. (1994) realizaram teste utilizando o *kit* comercial para Pneumonia Progressiva dos Ovinos (OPP) e antígeno CAEV, e concluíram que o teste utilizando antígeno CAEV foi, consideravelmente, mais sensível do que o utilizando antígeno OPP (91% *versus* 56%). Esta diferença pode ser explicada pela divergência que ocorre entre as seqüências dos genes *gag* e *env* entre as duas linhagens virais, visto que são as regiões do genoma viral sujeitas a mais variações.

O outro teste preconizado pela OIE é o teste de ELISA, que é específico, sensível, rápido e passível de ser automatizado, o que permite processar um número maior de amostras quando comparado com a IDGA (MOTHA e RALSTON, 1994), sendo por isso indicado em programas de controle para LVPR (SAMAN et al., 1999). A sensibilidade deste teste depende do tipo de antígeno empregado e do sistema de amplificação de sinal (conjugado). Existem muitos ELISA utilizados para diagnóstico de LVPR (Tabela 2), indiretos, competitivos, cinéticos, empregando como antígenos vírus completos ou proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos, e como conjugado anticorpos policlonais ou monoclonais marcados com peroxidase, proteína G, ou sistema biotina-avidina.

Os ELISA que utilizam como antígeno o vírus completo apresentam a desvantagem de revelar muitas reações falso-positivas devido a ligações inespecíficas entre o soro e as proteínas celulares co-purificadas na preparação do antígeno (ROSATI et al., 1994). LAMBERT et al. (1998), em um ELISA para *Mycoplasma agalactiae*, observaram um número elevado de resultados falso-positivos, os quais foram reduzidos pela utilização de conjugados empregando anticorpos monoclonais ou a proteína-G. A proteína-G apresenta alta afinidade para imunoglobulinas de ruminantes (ZANONI et al., 1989).

Nos testes onde são empregados como antígeno proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos apresenta especificidade superior, com duas vantagens importantes:

1. Seu uso elimina a necessidade de se trabalhar com cultura de tecidos convencionais para produzir antígenos virais;

2. A pureza das proteínas recombinantes reduz a frequência de resultados falso-positivos (KWANG et al., 1995).

Atualmente, têm sido desenvolvidos ELISA competitivos (ELISA-c), utilizando anticorpos monoclonais anti-p28, que apresentam uma alta especificidade; quando anticorpos monoclonais anti-p90 foram utilizados o teste apresentou alta especificidade e sensibilidade, reprodutibilidade e baixa variabilidade (FEVEREIRO et al., 1999). HOUWERS e SCHAAKE (1987) afirmaram que o ELISA-c é menos sensível do que a IDGA e o ELISA indireto, e apontam como única vantagem do teste a praticidade do processo de produção do antígeno. Entretanto, HERMANN et al. (2003a) e HERMANN et al. (2003b) afirmam que este teste apresenta outra vantagem: a utilização de soro não diluído, o que permite a detecção de baixos títulos de anticorpos, minimizando a ocorrência de resultados falso-negativos. Estes resultados sugerem a superioridade dos ELISA-c em relação à IDGA, porque no primeiro são mensurados anticorpos anti-gp135 sem avaliação subjetiva, e também a possibilidade do uso de leite e colostro como amostra.

**Tabela 2** – Lista de testes de ELISA utilizados para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

	<b>Antígeno</b>	<b>Referência</b>
ELISA-c <sup>1</sup>	MVV- ZZV1050	HOUWERS e SCHAAKE (1987)
	WLC-1	FEVEREIRO et al. (1999); HERMANN et al. (2003b)
	CAEV-63	ÖZYÖRUK et al. (2001); CHEEVERS et al. (2003); HERMANN et al. (2003a); TRUJILLO et al. (2004)
ELISA-k <sup>2</sup>	CAEV	VANDER SCHALIE et al. (1994)

<sup>1</sup> Elisa competitivo

<sup>2</sup> Elisa cinético

**Tabela 2 (cont.)** – Lista de testes de ELISA utilizados para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

	<b>Antígeno</b>	<b>Referência</b>
ELISA-i <sup>3</sup> com vírus completo	CAEV	SCHROEDER et al. (1985); ARCHAMBAULT et al. (1988); HECKERT et al. (1992); MOTHÁ e RALSTON (1994); ZANONI et al. (1994); CASTRO et al. (1999a); SIMARD et al. (2001)
	MVV- ZZV1050	HOUWERS et al. (1982); DAWSON et al. (1982)
	MVV	SIMARD e BRISCOE (1990a); SIMARD e BRISCOE (1990b); ROSATI et al. (1994); KEEN et al. (1995)
	WLC-1	BRODIE et al. (1992)
ELISA-i <sup>3</sup> com proteína recombinante ou peptídeo sintético	rp17; rp28	RIMSTAD et al. (1994); NORD et al. (1998)
	rTM	ROSATI et al. (1995); KEEN et al. (1995); KEEN et al. (1996)
	rCA+rTM	KWANG et al. (1995); PASICK (1998b); DE MARTINI et al. (1999); VAREA et al. (2001); GREGO et al. (2002)
	rp28+rgp40 rp28+rgp50	CLAVIJO e THORSEN (1995); POWER et al. (1995)
	rp16;      rp25; rgp46	KEEN et al. (1995); CELER et al. (1998); SAMAN et al. (1999); TURIN et al. (2005)
	rgag	ZANNONI et al. (1991)
	Peptídeos sintéticos	KWANG e TORRES (1994)

<sup>3</sup>ELISA indireto

O *western blot* (WB) é classificado como teste complementar, sendo mais sensível que o ELISA, pois minimiza a ocorrência de reações inespecíficas, reduzindo, conseqüentemente, os resultados falso-positivos, sendo comumente utilizado como *gold standard* na validação de ELISA para diagnóstico de LVPR (ZANONI et al., 1989).

De acordo com KURIEN e SCOWELD (2006) o WB apresenta algumas vantagens específicas:

1. As membranas são fáceis de manusear;
2. As proteínas imobilizadas na membrana são acessíveis a qualquer tipo de ligante e facilmente visualizadas;
3. Uma pequena quantidade de reagentes é requerida;
4. É possível estocar as membranas antes do uso por tempo prolongado.

Muitos WB vêm sendo desenvolvidos para diagnóstico de LVPR, utilizando antígenos produzidos e purificados com protocolos diferentes (Tabela 3a e 3b). Em animais natural e experimentalmente infectados, as proteínas detectadas foram a gp135, gp70, p25, p14, p16 (HOUWERS e NAUTA, 1989). Além dessas surgiram outras proteínas nos animais experimentalmente infectados a k35, k50, k20, sendo a última talvez o produto da clivagem da gp135 ou um contaminante glicosilado. Os autores afirmam que o WB não apresenta sensibilidade para detectar anticorpos contra proteínas glicosiladas, como a gp135, isto pode ser explicado pelo processo de purificação de antígeno que foi empregado. Quando se utiliza gradiente descontínuo sacarose para purificar antígeno as partículas virais podem romper e perder o antígeno de envelope durante as etapas de purificação (KAJIKAWA et al., 1990). Uma proteína de 105 kDa (gp105) resultante da degradação da gp135 pode aparecer no *blot* (KAJIKAWA et al., 1990).

Recentemente um WB empregando proteínas recombinantes, rp25 e rTM, foi desenvolvido e o WB rTM demonstrou ser mais sensível do que rp25 (96,09% *versus* 84,82%), ambos os testes apresentaram 100% de especificidade (CELER e CELER, 2001).

Em um estudo comparativo entre WB e a imunoprecipitação (RIPA) observou-se que o WB foi 12 vezes mais sensível para detectar anticorpos anti-capsídeo (p28) do que a RIPA, além desta detecção ter sido precoce em animais positivos, sugerindo que o WB é um teste sorológico



confirmatório melhor do que a RIPA para determinar o *status* de infecção para OPPV (MYERS-EVERT e HERMANN-HOESING, 2006).

**Tabela 3a** – *Western blot* para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) utilizando antígeno recombinante

<b>Antígeno</b>	<b>Proteína (kDa)</b>	<b>Referência</b>
MVV-K1514 e rp25-rTM <sup>1</sup>	40kDa; 25kDa	CELER e CELER (2001)
CAEV rgp38; rgp90 <sup>2</sup>	90kDa; 38kDa	MCGUIRE et al. (1992)
CAEV p28-p17 <sup>2</sup>	28kDa; 17kDa	NORD et al. (1998)

<sup>1</sup>Antígeno MVV recombinante

<sup>2</sup>Antígeno CAEV recombinante

**Tabela 3b** – *Western blot* diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

<b>Antígeno</b>	<b>Proteína (kDa)</b>	<b>Referência</b>
MVV-ZZV1050	135kDa; 70kDa; 25kDa; 16kDa; 15kDa	HOUWERS e NAUTA (1989)
MVV-ZZV1050	130kDa; 40kDa; 28kDa; 15kDa	ZANONI et al. (1989)
WLC-1 <sup>1</sup>	105kDa; 28kDa; 16kDa; 14kDa	KAJIKAWA et al. (1990)
CAEV	135kDa; 70kDa; 28kDa	HECKERT et al. (1992)
WLC-1	105kDa; 55kDa; 25kDa; 16kDa; 14kDa	BRODIE et al. (1992)
MVV-K1514	135kDa; 44kDa; 35kDa; 25kDa; 16kDa; 14kDa	TORFASON et al. (1992)
CAEV	42kDa; 27kDa	LERONDELLE et al. (1995)
CAEV 75-G63 <sup>2</sup>	40kDa; 28kDa; 17kDa	STORSET et al. (1997)
CAEV-63 <sup>2</sup>	135kDa	ÖZYÖRUK et al. (2001); CHEEVERS et al. (2003); TRUJILLO et al. (2004)
MVV-EV1	46kDa ; 25kDa ; 17kDa; 14kDa	VAREA et al. (2001)
CAEV <sup>2</sup>	55kDa; 28kDa	HAZIZA et al. (2001)
CAEV	25kDa; 18kDa; 15kDa	TURIN et al. (2005)
WLC-1	135kDa; 25kDa; 16kDa; 14kDa	CELER et al. (1998)
WLC-1	135kDa; 90kDa; 28kDa	MYERS-EVERT e HERMANN-HOESING (2006)
CAEV-63 <sup>2</sup>	135kDa	ÖZYÖRUK et al. (2001); CHEEVERS et al. (2003); TRUJILLO et al. (2004)
MVV-EV1	46kDa; 25kDa; 17kDa; 14kDa	VAREA et al. (2001)

<sup>1</sup> Linhagem de OPP<sup>2</sup> Blot utilizando anticorpos monoclonais (Mabs) anti p17/p28 e anti-gp135

### 3.2.4.2 Métodos Diretos

Outro diagnóstico complementar é a reação em cadeia de polimerase (PCR), considerado um método de diagnóstico direto, sensível e específico, pois amplifica fragmentos de RNA ou do DNA-proviral, mesmo em pequenas quantidades (ZANONI et al., 1992; REDDY et al., 1993), conseguindo identificar animais positivos em estágios precoces de infecção (WAGTER et al., 1998). A especificidade da amplificação depende do desenho dos *primers*, sendo um problema, também, a contaminação que ocorre durante a execução da prova, podendo revelar resultados falso-positivos (PFEFFER et al., 1995). Uma falha na amplificação pode estar correlacionada à baixa carga viral (REDDY et al., 1993; ELTAHIR et al., 2006, RAVAZZOLO et al., 2006), uma vez que a sensibilidade do PCR de animais com manifestação clínica foi maior do que nos animais sem sintomas (EXTRAMIANA et al., 2002). Outro fator que pode ser citado como responsável pela diminuição da sensibilidade da PCR é a diversidade de seqüências virais devido às mutações sofridas pelos LVPR, que influenciam na eficiência dos *primers* (ELTAHIR et al., 2006).

Devido à baixa carga viral na fase pós-soroconversão, os testes de PCR são menos sensíveis do que os testes sorológicos porém, antes da soroconversão, o PCR é mais sensível em detectar animais infectados, por isso, para que se tenha um diagnóstico preciso do *status* da infecção por LVPR, o ideal é associar os resultados das técnicas sorológicas aos da PCR (ELTHAIR et al., 2006).

Muitos PCR têm sido desenvolvidos para diagnóstico de LVPR (Tabela 4) utilizando uma grande variedade de amostras de células e tecidos para extração de RNA ou de DNA como sangue total, leucócitos, leite e sêmen. Quando se trabalha com PCR utilizando sangue, dois fatores são importantes para assegurar a sensibilidade do teste: o primeiro é a origem e o método escolhido para extração de DNA ou RNA e o outro o *status* clínico do animal (EXTRAMIANA et al., 2002; RAVAZZOLO et al., 2006); esta sensibilidade pode ser incrementada aumentando-se o número de monócitos usados para extração de DNA (WAGTER et al., 1998).

A partir dos produtos de um PCR (*amplicons*), outra prova de PCR pode ser realizada, o *nested* PCR, que geralmente é utilizado quando o PCR, com um único par de *primers*, não foi capaz de detectar o número de cópias provirais disponíveis. Utiliza-se então um segundo par de *primers*, que irá amplificar regiões mais internas de um gene (CHEEVERS et al., 2003). São confiáveis, sensíveis e específicos, capazes de detectar muitas linhagens de LVPR de sangue

total, leucócitos e de outras células infectadas (ELTHAIR et al., 2006). Segundo CHEBLOUNE et al. (1996), os *nested* PCR são capazes de detectar até 10 células infectadas em amostras contendo  $10^6$  ou  $10^7$  células.

**Tabela 4** – PCR desenvolvidos para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

	<b>Gene amplificado</b>	<b>Referência</b>
RT-PCR <sup>1</sup>	<i>pol</i>	LEROUX et al. (1995b)
	<i>env</i>	LEROUX et al. (1997)
	<i>pol, tat, vif</i>	CASTRO et al. (1999b)
	<i>gag, pol</i>	SHAH et al. (2004)
	<i>gag</i>	CORTEZ ROMERO et al. (2006)
	<i>env, rev</i>	RAVAZZOLO et al. (2006)
Q-PCR <sup>2</sup>	<i>pol</i>	ZHANG et al. (2000)
PCR <i>in situ</i>	<i>pol</i>	SANNA et al. (1999)
		CARPUCCHIO et al. (2003)
		CARROZA et al. (2003)
PCR <i>real time</i>	<i>env, rev</i>	RAVAZZOLO et al. (2006)

<sup>1</sup> PCR realizado com RNA

<sup>2</sup> PCR competitivo

**Tabela 4 (cont.)** – PCR desenvolvidos para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

	<b>Gene amplificado</b>	<b>Referência</b>
PCR <sup>1</sup>	LTR, <i>gag</i> e <i>pol</i>	ZANONI et al. (1992)
	<i>pol</i>	RUSSO et al. (1997); ZHANG et al. (2000)
	<i>gag</i>	REDDY et al. (1993); WAGTER et al. (1998); CELER et al. (2000); LAMARA et al. (2001); LAMARA et al. (2002b); FIENI et al. (2003)
	<i>pol</i> , LTR	BRODIE et al. (1992); ÁLVAREZ et al. (2006)
	LTR	EXTRAMIANA et al. (2002); BENAVIDES et al. (2006)
	<i>pol</i> , <i>env</i>	TRAVASSOS et al. (1999)
	<i>gag</i> , <i>pol</i>	GREGO et al. (2002)
	<i>env</i>	LEROUX et al. (1997); GONZÁLEZ et al. (2005)
Nested-PCR <sup>2</sup>	<i>env</i>	LEROUX et al. (1997); CHEEVERS et al. (2003)
	<i>gag</i>	KONISHI et al. (2004); LECHAT et al. (2005); CORTEZ ROMERO et al. (2006); ALI AL AHMAD et al. (2006)
	<i>pol</i>	RUSSO et al. (1997); CARPUCCHIO et al. (2003); ELTHAIR et al. (2006)

<sup>1</sup> PCR utilizando DNA-proviral<sup>2</sup> PCR utilizando segundo par de *primers*

### 3.3 PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO

A purificação de proteínas pode ser dividida em quatro etapas genéricas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultura (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e finalmente, operações para acondicionar o produto final. A clarificação pode ser realizada empregando-se filtração, centrifugação ou floculação; para purificação de baixa resolução podem ser utilizadas a precipitação, ultrafiltração e a extração em sistemas de duas fases líquidas. Na purificação de alta resolução, as cromatografias (troca-iônica, afinidade, imunoafinidade, interação hidrofóbica, de exclusão molecular) e as membranas adsorptivas podem ser empregadas; como tratamento final pode ser realizado a cristalização, liofilização e secagem (PESSOA JR e KILIKIAN, 2005)

Os processos empregados na produção e purificação de antígenos para testes diagnósticos podem influenciar em sua sensibilidade e especificidade (CELER e CELER, 2001). Muitos protocolos de produção e purificação de antígenos para diagnóstico vêm sendo desenvolvidos (Tabela 5). HOUWERS et al. (1982) produziram antígeno para teste de ELISA a partir de cultura de células de plexo coróide ovino infectadas com Maedi-Visna (ZZV-1050) utilizando centrifugação a 8.500g *overnight*, seguida de uma centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (25%) e tratamento com éter. ARCHAMBAULT et al. (1988) descrevem um protocolo para produção de antígeno CAEV, onde este antígeno foi concentrado 100 vezes por filtração pressurizada, e, em seguida, submetido à centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose (17-55%).

ZANONI et al. (1994) produziram antígeno completo, derivado de lentivírus ovino, por centrifugação a 55.000g, seguido de centrifugação a 90.000g, em gradiente descontínuo de sacarose de 20-40%, por 16 horas, e novamente centrifugado a 90.000g, desta vez em gradiente descontínuo de sacarose de 15-50%. SIMARD e BRISCOE (1990a) descrevem protocolo onde o antígeno de Maedi-Visna é centrifugado a 106.000g, o sobrenadante desta centrifugação é submetido a uma cromatografia com *Sepharose*, as frações da cromatografia contendo as proteínas virais são somadas, submetidas a uma cromatografia de troca iônica utilizando *Sephadex G-200*; as frações são somadas e tratadas com dodecil sulfato de sódio (SDS). Em outro estudo SIMARD e BRISCOE (1990b) utilizaram duas etapas com centrifugação a 106.000g e tratamento com SDS para produção de antígeno. SIMARD et al. (2001) produziram antígeno

CAEV pela extração, concentração e precipitação com polietilenoglicol (PEG) 8.000 *overnight*, seguida de centrifugação 2.000rpm e tratamento com SDS.

Alguns protocolos são laboriosos e demorados, de custo elevado, pois contempla várias etapas de centrifugação, requerendo uma estrutura laboratorial sofisticada; outros são simples e rápidos, porém o rendimento e a pureza do antígeno produzido são baixos.

**Tabela 5** – Protocolos de purificação de antígeno para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

Antígeno/ Teste	Protocolo de purificação	Referências
MVV- ZZV1050 ELISA	Clarificação; Centrifugação <i>overnight</i> ; <i>Pellet</i> TNE <sup>1</sup> ; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> PBS <sup>3</sup> + éter	HOUWERS et al. (1982); HOUWERS e SCHAAKE (1987); HOUWERS e NAUTA (1989); ROSATI et al. (1994)
CAEV ELISA	Clarificação; Centrifugação <i>overnight</i> ; <i>Pellet</i> TNE; Clarificação; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> PBS + éter	SCHROEDER et al. (1985)
CAEV ELISA	Filtração pressurizada; <i>Pellet</i> TNE; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TNE	ARCHAMBEULT et al. (1988); RIMSTAD et al. (1994)
MVV ELISA	Clarificação; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> tampão B; Cromatografia Sepharse; Cromatografia Sephadex; <i>Pellet</i> TN <sup>4</sup> + SDS <sup>5</sup> 0,1%	SIMARD e BRISCOE (1990a)
MVV ELISA	Clarificação; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> tampão B; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> TN + SDS 0,1%	SIMARD e BRISCOE (1990b)
WLC-1 WB	Clarificação; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> TNE	KAJIKAWA et al. (1990); HECKERT et al. (1992)
WLC-1 ELISA/WB	Clarificação; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> TNE <sup>1</sup>	BRODIE et al. (1992)
MVV- ZZV1050 WB	Sulfato de amônia; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> TNE	ZANONI et al. (1992)
CAEV ELISA	Clarificação; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> tampão B; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> TN <sup>4</sup>	HECKERT et al. (1992)
MVV- K1514 WB	Clarificação; Centrifugação; <i>Pellet</i> meio de cultura; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; Centrifugação; <i>Pellet</i> TNE	TOFARSON et al. (1992)

<sup>1</sup> TNE – Solução tampão TRIS + NaCl + EDTA

<sup>2</sup> Gradiente descontínuo de sacarose 15-50%

<sup>3</sup> PBS – Solução salina fosfatada

<sup>4</sup> TN – Solução tampão TRIS + NaCl

<sup>5</sup> SDS – Dodecil sulfato de sódio ou Lauril sulfato de sódio



**Tabela 5 (cont.)** – Protocolos de purificação de antígeno para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

<b>Antígeno/ Teste</b>	<b>Protocolo de purificação</b>	<b>Referências</b>
CAEV ELISA	Tratamento das células com SDS <sup>5</sup> 0,1%; Agitação; Centrifugação; Sobrenadante (antígeno)	VANDER SCHAILE et al. (1994)
OLV ELISA	Clarificação; Centrifugação <i>Pellet</i> TNE; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TNE; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TNE	ZANONI et al. (1994)
CAEV WB	10 <sup>6</sup> células; Lavagem com PBS <sup>3</sup> ; Lise com tampão de Laemmli	CLAVIJO e THORSEN (1995)
CAEV ELISA	Clarificação; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TRIS-HCl	TURIN et al. (2005)
CAEV75-G63 WB	Clarificação; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TNE <sup>1</sup>	STORSET et al. (1997)
WLC-1 ELISA/WB	Clarificação; Ultracentrifugação; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TNE + SDS <sup>5</sup> 0,25%	CELER et al. (1998)
WLC-1 ELISA	Clarificação; PEG <sup>6</sup> 8000/NaOH 0,4M (7%); Centrifugação; <i>Pellet</i> TNE; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; Ultracentrifugação; <i>Pellet</i> TNE	FEVEREIRO et al. (1999)
MVV-k1514 WB	Clarificação; Ultracentrifugação; Ultracentrifugação + sacarose <sup>2</sup> ; <i>Pellet</i> TNE	CELER e CELER (2001)
CAEV ELISA	Clarificação; PEG 8000/NaOH 0,4M (30%); Centrifugação; <i>Pellet</i> PBS <sup>3</sup>	SIMARD et al. (2001)

<sup>1</sup> TNE – Solução tampão TRIS + NaCl + EDTA

<sup>2</sup> Gradiente descontínuo de sacarose 15-50%

<sup>3</sup> PBS – Solução salina fosfatada

<sup>4</sup> TN – Solução tampão TRIS + NaCl

<sup>5</sup> SDS – Dodecil sulfato de sódio ou Lauril sulfato de sódio

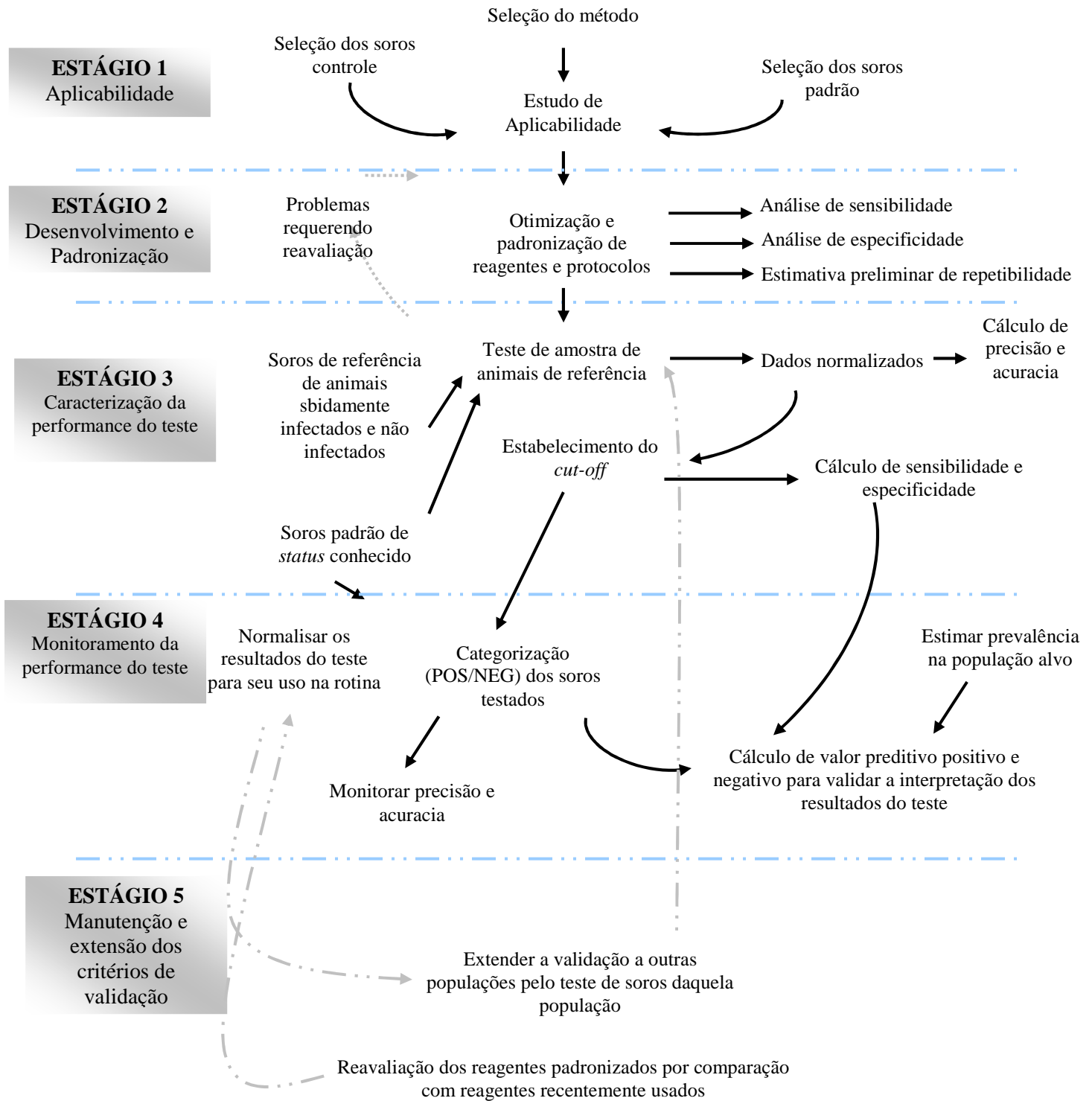
<sup>6</sup> PEG – Polietilenoglicol

### 3.4 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TESTES DIAGNÓSTICOS

O desenvolvimento e validação de um teste é um processo laborioso que consiste pelo menos em cinco estágios: 1) Determinação de sua aplicabilidade para um uso particular; 2) Escolha, otimização, e padronização dos reagentes, técnicas e métodos; 3) Determinação das características de desempenho do teste (sensibilidade e especificidade); 4) Monitoramento contínuo de seu desempenho; e 5) Manutenção e realce dos critérios de validação durante o uso rotineiro do teste (Figura 4) (OIE, 2006).

Para que um ensaio ou teste seja utilizado com fins de diagnóstico é necessário que este esteja validado e padronizado. A validação de um ensaio ou teste fornece consistentemente resultados que identificam animais como positivo ou negativo para uma análise ou um processo, e por inferência, prediz exatamente o *status* da infecção dos animais com um grau predeterminado de certeza estatística. Nesta definição, a sensibilidade e especificidade são características de desempenho do teste. Um teste pode ser reconhecido como validado se as estimativas de confiança de sensibilidade e de especificidade para uma dada população alvo já tiverem sido estimadas, quando temos baixa prevalência de uma determinada enfermidade, os valores baixos de sensibilidade e especificidade podem ser compensados pela amostragem ou combinando com outros testes sorológicos (OIE, 2006).

A validade de um teste diagnóstico pode ser estimada com base em seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), que são próprios do teste e não sofrem influência da prevalência da enfermidade para a qual se destina seu uso (ASTUDILLO e KANTOR, 1981). Classicamente, a sensibilidade é definida como o percentual de verdadeiros positivos identificados no teste, e a especificidade o dos verdadeiros negativos, quando comparados com um teste de referência, que pode ser um teste consagrado como *gold standard* ou outro de uso clássico. Os valores preditivos de um teste diagnóstico são dependentes da sensibilidade, especificidade do teste e da prevalência de uma determinada enfermidade na população.



**Figura 4** – Etapas do processo de validação de um teste diagnóstico (adaptado OIE, 2006).

#### 4 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**, v.18, n. 2, p.57-60, 1998.

ADAMS, D.S., GORHAM, J.R. The gp 135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p 28 in immunodifusion serology. **Research Veterinary Science**, v.40, p.157-160, 1986.

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

ADAMS, D.S., CRAWFORD, T.B., BANKS, K.L. et al. Immune response of goats persistently infected with caprine arthritis encephalitis virus. **Infectious Immunology**, v.28, p.421-427, 1980.

AGNARDÖTTIR, G.; THORSTEINSDÓTTIR, H.; ÓSKARSSON, T. et al. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 1901-1905, 2000.

AKERSTROM, B.; BRONDIN, T.; REIS, K. et al. Protein G a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **Journal of Immunology**, v.135, p.2589-2592, 1985.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L. et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. **Theriology**, v. 64, p. 1656-1666, 2006.

ÁLVAREZ, V.; DALTABUIT-TEST, M.; ARRANZ, J. et al. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p.226-234, 2006.

ÁLVAREZ, V.; ARRANZ, J.; DALTABUIT-TEST, M. et al. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 237-243, 2005.

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.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. et al. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-423, 1999.

ARCHAMBAULT, D.; EAST, N.; PERK, K.; DAHLBERG, J.E. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n.5, p. 971-975, 1988.

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

BENAVIDES, J.; FUERTES, M.; GARCÍA-PARIENTE, C. et al. Natural cases of Visna in sheep with myelitis as the sole lesion in the central nervous system. **Journal Comparative Pathology**, v. 134, p. 219-230, 2006.

BLONDIN, I., GRILLET, C., THIOGANE, Y. Syncytia formation in cultures and analysis of the protein composition of various strains of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Annales Recherche Vétérinaire**, v.20, p.153-158, 1989.

BOLEA, R.; MONLEÓN, E.; CARRASCO, L. et al. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. **Veterinary Research**, v. 37, p. 133-144, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 87, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2004a. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10454>. Acessado em 04/04/2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Nº 103, DE 07 DE DEZEMBRO DE 2004b. Submete à consulta pública, por um prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da data da publicação desta Portaria, o Projeto de Instrução Normativa e seus Anexos, que aprova o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Lentiviroses de Pequenos Ruminantes. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10453>. Acessado em 04/04/2006.

BRODIE, S.J.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; KOENIG, G. et al. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. **Journal of Infectious Disease**, v.169, p.653-657, 1994.

BRODIE, S.J.; PEARSON, L.D.; SNOWDER, G.D. et al. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. **Archives of Virology**, v. 130, p. 413-428, 1992.

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

CARPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M.P. et al. Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 37-43, 2003.

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. Política Oficial em Sanidade Ovina no Brasil. **In: Anais.... XXXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)**, 2006.

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; AZEVEDO, E. O. et al. Seroconversion and seroreactivity patterns of dairy goats naturally exposed to caprine arthritis-encephalitis virus in Brazil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 603-607, 2002.

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

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M. et al. A Labelled Avidin-Biotin ELISA to Detect Antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis Virus in Goats Sera. **Veterinary Research Communications**. v. 23, p. 512-522, 1999a.

CASTRO, R. S.; GREENLAND, T.; LEITE, R. C. L. et al. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 1583-1589, 1999b.

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.

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.; NEMCOVA, H.R. et al. Serologic diagnosis of lentivirus by whole virus ELISA and AGID test. **Journal of Veterinary Medicine – Series B**, v. 45, p. 183-186, 1998.

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.

CHEEVERS, W.P.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C. et al. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. **Laboratory Investigation**, v.58, p.510-517, 1988.

CHUNG, Y. S. e O’SULLIVAN, B. M. Isolation of caprine-arthritis virus and detection of agar-gel immunodiffusion antibodies in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 37-38, 1981.

CLAVIJO, A. e THORSEN, J. Serological diagnosis of caprine arthritis-encephalitis by ELISA with two recombinant proteins in a parallel testing format. **Journal of Immunoassay**, v. 16, p. 419-436, 1995.

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 and their replication. **In**: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Fields Virology. Philadelphia, Lppincott-Raven, p. 1767-1847, 1996.

CONSTABLE, P.D.; MEIER W.A.; FOLEY G.L. et al. Visna-like in a ram with chronic demyelinating encephalitis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 208, p. 117-120, 1996.



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

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-MOREIRA, M.; OELEMANN, W.M.R.; LILENBAUM, W. Comparasion of serological methods for the diagnostic of caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 48-50, 2005.

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.

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

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

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

CUTLIP, R. C. e LAIRD, G. A. Isolation and characterization of a virus associated with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 37, p. 1377-1382, 1976.

DALZIEL, R.G.; HOPKINS, J.; WATT, N.J. et al. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. **Journal of General Virology**, v.72, p.1905-1911, 1991.

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.

DAWSON, M.; CHASEY, D.; KING, A.A. The demonstration maedi/visna in sheep in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 105, p. 220-223, 1979.

DAWSON, M.; BIRONT, P.; HOUWERS, D.J. Comparasion of serological tests used in three state veterinary laboratories to indenty maedi-visna virus infection. **Veterinary Record**, v. 111, p. 432-434, 1982.

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

de la CONCHA-BERMEJILLO, A., BRODIE S.J., MAGNUS-CORRAL S., et al. Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal of Acquiride Immune Deficient Syndrome and Human Retrovirology**. v. 8, p. 116-123, 1995.

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

DeMARTINI, J. C.; HALSEY, W.; BOSHOFF, C. et al. Comparasion of a maedi-visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assay for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 29-40, 1999.

ELLIS, T. M.; CARMAN, H.; ROBINSON, W. F. et al. The effect of colostrum-derived antibody on neo-natal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 242-245, 1986.

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.

EXTRAMIANA, A. B.; GONZÁLEZ, L.; CORTABARRÍA, N. et al. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. **Small Ruminant Research**, v. 44, p. 109-118, 2002.

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

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K. et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**. v.59, p.1515-1523. 2003.

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

GONZÁLEZ, A.; REINA, R.; GARCÍA, I. et al. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. **Vaccine**, v.23, p. 4342–4352, 2005.

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

GREENWOOD, P. L.; NORTH, R. N.; KIRKLAND, P. D. Prevalence, spread and control of caprine arthritis-encephalitis virus in dairy goat herds in New South Wales. **Australian Veterinary Journal**, v. 72, p. 341-345, 1995b.

GREGO, E.; PROFITI, M.; GIAMMARIOLI, M. et al. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 828-832, 2002.

HAASE, T.A. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, v.322, p.130-136, 1986.

HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 37, p. 31-39, 1996.

HARMACHE, A.; VITU, C.; GUIGUEN, F. et al. Priming with *tat*-deleted caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. **Journal of Virology**, v. 72, p. 6796-6804, 1998.

HARMACHE, A.; VITU, C.; GUIGUEN, F. et al. Requirement of caprine arthritis-encephalitis virus *vif* gene for *in vivo* replication. **Virology**, v. 224, p. 246-255, 1996a.

HARMACHE, A.; RUSSO, P.; VITU, C. et al. Replication in goats *in vivo* of caprine arthritis-encephalitis virus deleted in *vif* or *tat* genes: possible use of these deletion mutants as live vaccines. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 12, p. 409-411, 1996b.

HARMACHE, A.; RUSSO, V. P.; BOUYAC, M. et al. The caprine arthritis encephalitis virus *tat* gene is dispensable for efficient viral replication *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Virology**, v. 69, p. 5445-5454, 1995a.

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

HAZIZA, B.; CHAUVIN, J. P.; GLUSCHANKOF, P. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus: evidence for a B/D-type assembly pathway in a C-type lentivirus replication. **Virology**, v. 286, p. 434-445, 2001.

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.

HERRMANN, L. M.; CHEEVERS, W. P.; MARSHALL, K. T. et al. Detection of Serum Antibodies to Ovine Progressive Pneumonia Virus in Sheep by Using a Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 862–865, 2003a.

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

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.

HOUWERS, D.J. e SCHAAKE Jr, J. An improved ELISA for detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in one-step assay. **Journal of Immunological Methods**, v.98, p.151-154, 1987.

HOUWERS, D.J., VAN DER MOLEN, E.J. A five-year serological study of natural transmission of maedi-visna virus in a flock of sheep, completed with post mortem investigation. **Journal of Veterinary Medicine – Series B**, v.34, p.421-431, 1987.

HOUWERS, D.J., GIELKENS, A.L.J., JAN SCHAAKE, Jr. J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. **Veterinary Microbiology**, v.7, p.209-219, 1982.

HUSO, D.L.; NARAYAN, O.; HART, G.W. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **Journal of Virology**, v. 62, p. 1974-1980, 1988.

IBGE. [www..ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 14/01/2005.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviruses. **In:** FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Fields Virology. Philadelphia, Lppincott-Raven, p. 1777-1996, 1996.

JOLLY, P. E. e NARAYAN, O. Evidence for Interference, Coinfections, and Intertypic Virus Enhancement of Infection by Ovine-Caprine Lentiviruses. **Journal of Virology**, v. 63, p. 4682-4688, 1989.

KAJIKAWA, O.; LAIRMORE, M. D.; DEMARTINI, J.C. Analysis of Antibody Responses to Phenotypically Distinct Lentiviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 764-770, 1990.

KEEN, J.; KWANG, J.; LITLEDIKE, T. E. et al. Ovine lentivirus antibody detection in serum colostrum and milk using a recombinant transmembrane protein ELISA. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.51,p. 253-275, 1996.

KEEN, J.; KWANG, J.; ROSATI, S. Comparasion of ovine lentivirus detection by conventional and recombinant serological methods. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 47, p. 295-309, 1995.

KEMP, R. K.; KNOWLES, D. P.; PERRY, L. L. et al. Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. **Vaccine**, v. 18, p. 1282-1287, 2000.

KLEVJER-ANDERSON, P. e 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.Jr; EVERMANN, J.F.; SHROPSHIRE, C. et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.243-245, 1994.

KONISHI, M.; TSUDUKU, S.; HARITANI, M. et al. An Epidemic of Caprine Arthritis Encephalitis in Japan: Isolation of the Virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 911-917, 2004.

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.

KURIEN, B. T.; SCOWELD, H. R. Western blotting. **Methods**, v. 38, p. 283–293, 2006.

KWANG, J., KEEN, J., CUTLIP, R.C., KIM, H.S., de la CONCHA-BERMEJILLO, A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. **Small Ruminant Research**, v.16, p.171-177, 1995.

KWANG, J. e TORRES, J.V. Oligopeptide-Based Enzyme Immunoassay for Ovine Lentivirus Antibody Detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1813-1815, 1994.

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

LAMARA, A; FIENI, F.; MSELLI-LAKLHAL. L., et al. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis – encephalitis virus (CAEV). **Theriogenology**. v.58, p. 1153-1163. 2002b.

LAMARA, A; FIENI, F.; MSELLI-LAKLHAL. L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis – encephalitis virus in goat granulosa cell. **Virus Research**. v. 79, p. 165-172. 2001.

LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P. et al. Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 70, p. 326-330, 1998.

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

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.

LERONDELLE, C., GREENLAND, T., JANE, M., MORNEX, J.F. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.850-855, 1995.

LEROUX, C.; LERONDELLE, C.; CHASTANG, J. et al. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. **Veterinary Research**, v.28, p., 1997.

LEROUX, C.; GREENLAND, T.; MORNEX, J. F. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 12, p. 427-429, 1996.

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, 1995a.

LEROUX, C.; VUILLERMOZ, S.; MORNEX, J.F. et al. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentivirus obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. **Journal of General Virology**, v.76, p.1533-1537, 1995b.



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

McGUIRE, T.C.; KNOWLES, D.P. Jr.; DAVIS, W.C. et al. Transmembrane Protein Oligomers of Caprine Arthritis-Encephalitis Lentivirus Are Immunodominant in Goats with Progressive Arthritis. **Journal of Virology**, v. 66, p. 3247-3250, 1992.

MILHAU, N.; RENSON, P.; DREESEN, I. et al. Viral expression and leukocyte adhesion after in vitro infection of goat mammary gland cells with caprine arthritis-encephalitis virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 93-99, 2005.

MODOLO, J.R.; STACCHISSINI, A.V.M.; PADOVANI, C.R. et al. PCR associated with agar gel immunodiffusion for diagnosis of viral caprine arthritis-encephalitis. **Small Ruminant Research**, 2007 (no prelo).

MOTHA, M.X.J., RALSTON, J.C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. **Veterinary Microbiology**, v.38, p.359-367, 1994.

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.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; Du, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J.F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. **Virology**. v. 259, p. 67-73. 1999.

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

MYERS-EVERT, D. W. e HERMANN-HOESING, L. M. Ovine progressive pneumonia virus capsid is B-cell immunodominant using Western blot analysis: A comparison of sensitivity

between Western blot analysis and immunoprecipitation. **Journal of Virological Methods**, v. 137, p. 339-342, 2006.

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., KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D. et al. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection and Immunity**, v. 41, p. 67-73, 1983.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D. et al. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **Journal of General Virology**, v.50, p.69-79, 1980.

NORD, K.; LØKEN, T.; ORTEN, A. Control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in three Norwegian goat herds. **Small Ruminant Research**, v. 28, p. 109-114, 1998.

OIE. **Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres**, 2000. disponível em: <http://www.oie.int>. acesso: dez/2006.

OLIVEIRA, M.M.M.; CASTRO, R.S.; CARNEIRO, K.L. et al. Anticorpos contra Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos e ovinos sem raça definida (SRD) em abatedouros nos municípios de São Lourenço da Mata e Paulista do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 947 - 949, 2006.

ÖZYÖRÜK, F.; CHEEVERS, W.P.; HULLINGER, G.A. et al. Monoclonal Antibodies to Conformational Epitopes of the Surface Glycoprotein of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Potential Application to Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies in Goat Sera. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 44-51, 2001.

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

PASICK, J. Use of a recombinant maedi-visna virus protein ELISA for the serologic diagnosis of lentivirus infections in small ruminants. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 307-310, 1998b.

PESSOA JR, A. e KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Manole, São Paulo, 2005, 444p.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, C. et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v. 35, p. 257–274, 2004.

PFEFFER, M., WIEDMANN, M., BATT, C.A. Applications of DNA amplification techniques in veterinary diagnostics. **Veterinary Research Communication**, v.19, p.375-407, 1995.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; OLORTEGUI, C.C. Dot-Blot: alternativa para o diagnóstico da artrite-encefalite caprina (AEC). **Comunicado Técnico**,. Sobral/CNPC, n. 57, 4p., 2001.

PISONI, G.; BERTONI, G.; BOETTCHER, P. et al. Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: Comparative analysis and molecular epidemiological applications. **Virus Research**, v. 116, p. 159–167, 2006 2005.

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

PUGH, D.G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. Roca, São Paulo, 2005, 513p.

QUÉRAT, G.; BARBAN, V.; SAUZE, N. et al. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. **Journal of Virology**, v.52, p.672-679, 1984.

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

REDDY, P.G.; SAPP, W.J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.3042-3043, 1993.

REIS, J.C. **Estatística Aplicada à Pesquisa em Ciência Veterinária**. Olinda, 1ª ed. 651p., 2003.

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

ROLLAND, M.; CHAUVINEAU, C.; VALAS, S. et al. Establishment and characterization of a goat synovial membrane cell line susceptible to small ruminant lentivirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 118, p. 123–130, 2004.

ROSATI, S.; KWANG, J.; TOLARI, F. et al. A comparison of role virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. **Veterinary Research Communications**, v. 18, p. 73-80, 1994.

ROSATI, S.; PITTAU, M.; TOLARI, F. et al. Genetic e antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. **Veterinary Microbiology**, v. 45, p. 363-370, 1995.

RUSSO, P.; VITU, C.; BOURGOGNE, A. et al. Caprine Arthritis-Encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. **Veterinary Record**, v.140, p.483-484, 1997.

SAMAN, E.; EYNDE, G. V.; LUJAN, L. A New Sensitive Serological Assay for Detection of Lentivirus Infections in Small Ruminants. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 734–740, 1999.

SAMBROOK, J. e RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 3, p. , 2001.

SANNA, E.; SANNA, M. P.; VITALI, C. G. et al. Proviral DNA in the Brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, p. 271-276, 1999.

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. **Veterinary Microbiology**, v.39, p.369-378, 1994.

SCHROEDER, B.A.; OLIVER, R.E., CATHCART, A. The development and evaluation of an ELISA for detection of antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis virus in goat serum. **New Zealand Veterinary Journal**, v.33, p.213-219, 1985.

SARAIVA NETO, A.O.; CASTRO, R.S.; BIRGEL, E.H.; NASCIMENTO, S.A. Estudo soropidemiológico da Artrite-encefalite Caprina em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.15, n. 4, p.121-124, 1995.

SEDMAK, J.J. e GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, p. 544-552, 1977.

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

SIHVONEN, L.; NUOTIO, L.; RIKULA, U. et al. Preventing the spread of Maedi-Visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 47, p. 213-220, 2000.

SIMARD, C. L. e BRISCOE, M. R. Antibodies to Maedi-Visna Virus in Sheep I. A Simple Technique for Production of Antigen Using Sodium Dodecyl Sulfate Treatment. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 446-450, 1990a.

SIMARD, C. L. e BRISCOE, M. R. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Maedi-Visna Virus in Sheep II. Comparison to Conventional Agar Gel Immunodiffusion Test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 451-456, 1990b.

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.

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

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

SONIGO, P.; ALIZON, M.; STASKUS, K. et al. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. **Cell**, v.42, p.369-382, 1985.

STORSET, K.; EVENSEN, O.; RIMSTAD, E. Immunohistochemical Identification of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in Paraffin-embedded Specimens from Naturally Infected Goats. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 180-188, 1997.

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

TERPSTAR, C. e DeBOER, G. F. Precipitating antibodies against Maedi-Visna vírus in experimentally infected sheep. **Archives für die gesamte Virusforschung**, v. 43, p. 53-62, 1973.

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

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

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

TRUJILLO, J. D.; HÖTZEL, K. J.; SNEVIK, K. R. et al. Antibody response to the surface envelope of caprine arthritis-encephalitis lentivirus: disease status is predicted by SU antibody isotype. **Virology**, v. 325, p. 129-136, 2004.

TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M. L. et al. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 73–79, 2005.

VANDER SCHALIE, J.; BRADWAY, D.S.; BESSER, T.E.; EVERMANN, J.F. Evaluation of a kinetic enzyme-linked immunosorbent assay for detection of caprine arthritis-encephalitis virus – specific antibodies. **Journal of veterinary diagnostic investigation**. v. 6, p. 30-33. 1994.

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

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.

WAGTER, L. H. A.; JANSEN, A.; BLEUMINK-PLUYM, N. M. C. et al. PCR detection of lentiviral *gag* segments DNA in the white blood cells of sheep and goats. **Veterinary Research Communications**, v. 22, p. 355-362, 1998.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 760p., 2006.

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

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.

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

ZANONI, R. G.; NAUTA, I. M.; KUHNERT, P. et al. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses detected by PCR.. **Veterinary Microbiology**, v. 33, p. 341-351, 1992.

ZANONI, R., KRIEG, A., PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.580-582, 1989.



ZHANG, Z.; WATT, N.J.; HOPKINS, J.; HARKISS, G.; WOODALL, C.J. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Journal of virological methods**. v. 86, p. 13-20. 2000.

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. **American Journal of Pathology**, v.136, p. 843-854, 1990.

**EXPERIMENTO I**

---

---

---

**WESTERN BLOT PARA DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS  
RUMINANTES (LVPR) EM CAPRINOS USANDO PROTOCOLO SIMPLES PARA  
OBTENÇÃO DE ANTÍGENO**

Michele Moreira M. Oliveira<sup>1</sup>, Roberto Soares de Castro<sup>2</sup>, Márcia Almeida de Melo<sup>3</sup>,  
Paulo Paes de Andrade<sup>4</sup>, Sheila Machado Gomes<sup>5</sup>, Ana Claudia Campos<sup>5</sup>, Sérgio Alves do  
Nascimento<sup>6</sup>

**Resumo:** O sorodiagnóstico das lentiviroses de caprinos e ovinos é realizado em geral por imunodifusão em gel de ágar ou por ELISA. Ambos os métodos, embora relativamente simples, não identificam os antígenos virais reconhecidos na resposta imune do animal examinado. Por isso, o western blot vem ganhando maior relevância, particularmente na definição de padrões de reconhecimento antigênico ao longo da infecção, ou por diferentes vírus e espécies hospedeiras, podendo inclusive ser útil no diagnóstico propriamente dito. Neste trabalho, o antígeno empregado no *western blot* (WB), e demais ensaios auxiliares na padronização, foi obtido através de um sistema simplificado de purificação, iniciado com a concentração por diálise do sobrenadante de culturas celulares infectadas e seguido de centrifugação em gradiente contínuo de sacarose. A separação das proteínas foi obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% e a transferência realizada pelo sistema semi-úmido. A revelação indicou a presença de cinco proteínas virais reconhecidas pelo soro padrão positivo, com pesos moleculares (em kDa) de 14-16, 25, 40, 50 e 70. Todas as 8 amostras de soro caprino positivas reconheceram pelo menos uma banda no *immunoblot*, variando contudo o número de bandas reconhecidas. Reconhecimento de uma proteína única (n=3), de duas proteínas (n=3), de três proteínas (n=2) e de quatro proteínas (n=1). Reação positiva à gp40 foi observada em quatro animais, com intensidade de reação discreta em três deles. Dois animais apresentaram reação positiva à p16, e dois à gp50, embora pouco intensas. Quanto à gp70, proteína que reagiu com o soro padrão positivo, não foi reconhecida por nenhum dos soros testados. Estes resultados sugerem que o WB pode ser empregado para o sorodiagnóstico rotineiro da artrite-encefalite caprina a vírus (CAEV),

---

<sup>1</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária (PPGCV/UFRPE).

<sup>2</sup> Professor Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52.171-900, Recife-PE. E-mail: rscastro@dmv.ufrpe.br

<sup>3</sup> Professora Adjunta da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária/CSTR/UFCG.

<sup>4</sup> Professor Adjunto da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Depto. de Genética.

<sup>5</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

<sup>6</sup> Biólogo do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

ensejando estudos mais amplos do padrão de reconhecimento dos antígenos apresentados por este novo sistema de purificação parcial de componentes virais. A diferença de padrões de reconhecimento pode também ter relação com a forma clínica, tempo de infecção, origem e sexo dos animais e outros fatores, que poderão ser determinados no futuro e que têm importância na definição de padrões epidemiológicos e no manejo clínico. O antígeno purificado neste trabalho poderá também encontrar aplicação em outros ensaios sorodiológicos, inclusive naqueles recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

**Palavras-chave:** Células, córnea, purificação, CAEV, Maedi-Visna, *western blot*, diagnóstico.

**Abstract:** The serodiagnosis of small ruminant lentivirus (SRLV) infections in goats or sheep is usually performed by the agar-gel immunodiffusion technique (AGIT) and by ELISA. Therefore, the western blot (WB) is the choice for the definition of antigen recognition patterns during the disease progression or in infections due to different viruses and in different hosts, being potentially useful for the diagnosis itself. In this work, the antigen used for WB and in the supplementary assays for the standardization of a diagnostic protocol was obtained by a novel simple purification procedure, starting by the dialysis of the supernatant of infected cultured cells, followed by centrifugation in sucrose gradient. Proteins in the pellet were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis at 10% density and transferred to nitrocellulose membranes in a semi-dry blotting device. After development, five viral proteins were recognized by the standard positive serum sample, with molecular weights of 14-16, 25, 40, 50 e 70 kDa. All 8 positive goat serum samples recognized at least one band in the immunoblot, with different intensities, corresponding to the 25 kDa antigen. The total number of bands recognized by each serum sample varied considerably, as follows: one single band (n=3), 2 bands (n=3), 3 bands (n=2) and 4 bands (n=1). A positive reaction to gp40 was observed with 4 sera, although rather weak in 3 cases. Two samples were reactive to p16 and two others to gp50, although weakly. Curiously, no serum was reactive to the 70 kDa antigen, recognized by the standard positive serum sample. These results suggest that the WB can be effectively used for the routine serodiagnosis of viral caprine arthritis encephalitis infection (CAEV). It also supports further studies on antigen recognition patterns with the new antigen provided by the novel simplified purification system of viral components described here. Different recognition patterns may prove

to be related to the clinical outcome of the infection, its duration, host sex and origin and other factors, that may be of importance for the clinical management and control programs. The antigen obtained, as described here, may find a broader application in other diagnostic assays, including those recommended by the World Animal Health Organization (OIE).

**Keywords:** Cells, corneal, purification, CAEV, Maedi-Visna, western blot, diagnosis.

## INTRODUÇÃO

Os Lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) são agrupados em cinco grupos filogenéticos, representados por dois grupos mais importantes que contemplam os protótipos do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus de Maedi-Visna (MVV) (SHAH et al., 2004). Estes vírus causam infecção, caracterizada muitas vezes, por animais soropositivos aparentemente saudáveis; aproximadamente 25% dos caprinos e ovinos infectados com LVPR podem desenvolver artrite, sobretudo na articulação carpo-metacarpiana, encefalomielites, emagrecimento, mastite e pneumonia progressiva (CALLADO et al., 2001). Não existe tratamento para as LVPR nem vacinas eficazes. Por isso o diagnóstico é uma ferramenta essencial para o seu controle.

No Brasil, o Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose de Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR), que integra o Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2004), preconiza o uso da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) como teste diagnóstico para LVPR, e o *western blot* (WB), como prova confirmatória e com fins de certificação, que deverá ser realizada em laboratório oficial, em casos duvidosos. Embora preconizado pelo MAPA, o WB ainda não está disponível no país.

O WB tem sido utilizado comumente como padrão ouro (*gold standard*), em padronizações e validações de muitos testes de ELISA para diagnóstico de LVPR em ovinos (ZANONI et al., 1989) e também como ferramenta na análise da resposta imunológica de ovinos natural e experimentalmente infectados com Maedi-Visna (HOUWERS e NAUTA, 1989; KAJIKAWA et al., 1990), porém, relatos sobre sua aplicação em amostras caprina são escassos, sendo descrito apenas um WB recombinante (ROSATI et al., 1995).

Um ponto crucial no desenvolvimento de um teste sorológico é o processo de produção e purificação do antígeno empregado (CELER e CELER, 2001). Muitos protocolos para produção e purificação de antígeno com fins diagnósticos para LVPR têm sido estabelecidos. Estes empregam, de forma simples ou combinada, as seguintes técnicas: centrifugação simples, centrifugação e ultracentrifugação em gradiente contínuo ou descontínuo de sacarose, filtração pressurizada, cromatografias de troca-iônica e de afinidade, concentração e precipitação com polietilenoglicol 8.000 (PEG 8.000) (SIMARD et al., 2001; ZANONI et al., 1994; SIMARD e BRISCOE, 1990a; SIMARD e BRISCOE, 1990b; ARCHAMBAULT et al., 1988; HOUWERS et

al., 1982). A maioria destes protocolos é laboriosa e demorada, pois contempla várias etapas de processamento, requerendo uma estrutura laboratorial sofisticada.

Neste trabalho, estabeleceu-se um *western blot* (WB) para diagnóstico de lentivirose em caprinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultivo celular e infecção *in vitro*

Células epiteliais de córnea de feto, proveniente de mãe soronegativa para LVPR, obtidas por explantação foram cultivadas. Os explantes de córnea umedecidos em meio essencial mínimo de Eagle (MEM), suplementado com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngicos (fugizon ou anfotericina B), foram transferidos para garrafas plásticas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>, incubados a 37°C por 30 minutos, e adicionados 5 ml de MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), seguindo-se o cultivo a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até total confluência da monocamada celular. As culturas foram adaptadas em seguida para o sistema *roller*.

As monocamadas celulares subconfluentes, cultivadas em garrafas *roller*, foram infectadas com amostra viral CAEV Cork (NARAYAN et al., 1980). A partir do 10º dia pós-inoculação, a cada três dias, o sobrenadante (sbn) de cada garrafa era coletado e congelado, acrescentando-se às garrafas 200ml de MEM com 2% de SFB. As garrafas eram substituídas quando apresentavam mais de 80% de destruição da monocamada celular.

### Produção e avaliação dos antígenos

Para produção dos antígenos, os sbn foram congelados e descongelados três vezes, clarificados por centrifugação a 3.300g por 20 minutos, a 4°C e dialisados em membrana<sup>1</sup> de 33x21mm, contra polietilenoglicol (PEG 8.000) a 40% em PBS (pH 7,6), a 4°C durante 48 a 72 horas, até a concentração de aproximadamente 50 vezes (CALLADO, 1999), seguido de centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (25%) em TNE, a 21.460g por 2 horas e meia, a 4°C. O *pellet* foi ressuspenso em dodecil sulfato de sódio a 0,25%. Células não infectadas foram submetidas a este mesmo protocolo e utilizadas como controle negativo do antígeno no *dot-blot* e no WB. Para quantificar a concentração de proteína foi utilizada a técnica descrita por Bradford, modificada por SEDMAK e GROSSBERG (1977), utilizando como padrão a albumina sérica bovina (BSA).

A avaliação do antígeno purificado foi realizada através do WB, padronizado a partir de um *dot-blot*. Para tal, foram empregadas fitas de nitrocelulose com porosidade de 0,45µm de 5cmx0,5cm, sub-divididas em 10 quadrados de 0,5cm. Nestas foram distribuídos 2µl do antígeno

---

<sup>1</sup> INLAB, Brasil



em diluições duplas de 1/2 a 1/64, bem como o controle do antígeno, para determinar a sua diluição de uso. Após secagem por 20 minutos as fitas foram lavadas três vezes, por cinco minutos, sob leve agitação, com solução de lavagem TBST 0,1% (100mM de TRIS-HCl; pH8,0; 150mM de NaCl, 0,1% de tween 20) e bloqueadas com solução de bloqueio (TBST 0,1%, 1% de leite em pó desnatado [LPD]) (CELER et al., 1998), por uma hora, sob leve agitação, a temperatura de 25°-27°C. Os soros padrão positivo, de um *kit* comercial<sup>1</sup>, e o negativo, de um animal com resultado negativo, em três testes consecutivos de IDGA, foram diluídos (1/10 a 1/1.600) em solução diluente do soro (TBST 0,1%, 1% de LPD, 10mM de EDTA e 5% de SFB) e incubados a 37°C, por uma hora; distribuídos e as fitas incubadas como descrito anteriormente. O conjugado anti-cabra peroxidase utilizado no dot-blot e no WB foi produzido de acordo com CASTRO (1998). Este foi diluído, em solução diluente de conjugado (TBST 0,1%, 1% de LPD), de 1/100 a 1/800, distribuídos e incubado a temperatura ambiente, sob leve agitação, por uma hora; as fitas foram lavadas cinco vezes por cinco minutos, e o substrato 3'-3'-5'-5'-Tetrametilbenzidina (TMB), na concentração de 2,4 x 10<sup>-3</sup>/ml, adicionado. A reação foi parada com água destilada quando se observou reação do soro padrão positivo e boa diferenciação com a reação do soro padrão negativo.

Para o WB foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10%, a fim de se separar os polipeptídeos virais. O antígeno purificado foi diluído (1/2 a 1/256) em tampão de Laemmli preparado de acordo com HECKERT et al. (1992), com modificações nas concentrações de bromofenol (0,1%) e de 2-mercaptoetanol (4%), aquecido a 100°C por 5 minutos e carregados em dois géis descontínuos de poliacrilamida, em cuba vertical. Para a realização do SDS-PAGE foram utilizados o gel de corrida a 10% de acrilamida em solução tampão TRIS-HCl (1,5M; pH 8,8) e o gel de empacotamento a 4% de acrilamida em solução tampão TRIS-HCl (1,0M; pH 6,8). A solução tampão para corrida utilizada foi TRIS-Glicina (24Mm de TRIS, 250mM de glicina, 0,1% de SDS, pH 8,3) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). As condições de corrida dos géis foram corrente de 10mA e voltagem de 92mV, por aproximadamente uma hora e meia. Para determinação do peso molecular das proteínas do antígeno foi utilizado o marcador *BenchMark™ Protein Lader*<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Antígeno CAEV – IDGA; Biovetech®, Brasil

<sup>2</sup> Invitrogen, USA

Os polipeptídeos, assim separados, foram transferidos do gel para a membrana de nitrocelulose<sup>1</sup> de 0,45µm, pelo método de transferência *semi-dry* (KURIEN e SCOWELD, 2006). O tampão utilizado na transferência foi TRIS-glicina (24 mM de TRIS, 192mM de glicina, metanol 20%, pH 8,6) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). A transferência ocorreu por 40 minutos, a uma amperagem de 280mA e voltagem de 5mV. Em seguida as membranas foram embaladas em papel alumínio e conservadas a -20°C.

No momento do *immunoblot* as membranas foram descongeladas, cortadas em fitas de 0,2cm de largura, e bloqueadas, com solução de bloqueio (CELER et al., 1998), por uma hora a temperatura de 25-27°C, sob leve agitação, lavadas três vezes, com solução de lavagem, durante cinco minutos. Os soros foram diluídos 1/400, em solução diluente de soro, incubados a 37°C, por uma hora, distribuídos, nas fitas e incubadas a 25°-27°C, por uma hora sob leve agitação. Em seguida, três lavagens, por cinco minutos, foram executadas, e o conjugado anti-cabra peroxidase, diluído a 1/100, em solução diluente de conjugado, distribuído e as fitas incubadas nas condições anteriormente descritas. Após uma hora, as fitas foram lavadas cinco vezes, por cinco minutos, e o substrato TMB adicionado. A reação foi acompanhada e parada com água destilada, quando o soro padrão positivo reagiu e apresentou boa diferenciação com a reação do soro padrão negativo. Todos os diluentes, o conjugado e o substrato foram os mesmos utilizados no *dot-blot*.

Soros padrão positivo e negativo, e amostras de soros caprinos naturalmente infectados, identificados como positivos em dois testes de IDGA, consecutivos em intervalos de quatro meses, utilizando o *kit* comercial<sup>2</sup>, foram empregadas na avaliação do WB.

---

<sup>1</sup> Millipore, USA

<sup>2</sup> Antígeno CAEV – IDGA; Biovetech®, Brasil

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Cultivo celular**

As células epiteliais de córnea foram permissíveis à replicação da amostra viral CAEV Cork, apresentando por volta da 2<sup>o</sup> semana pós-inoculação (PI) efeito citopático (ECP) caracterizado pela formação de sincícios, resultante da fusão de células infectadas e não-infectadas, estes foram observados em torno da 7<sup>a</sup> passagem; as células continuaram permissíveis pelo menos até a 30<sup>a</sup> passagem, quando se encerrou a avaliação. ABREU et al. (1998) citam que o cultivo celular primário que apresenta melhor permissividade à amostra viral CAEV é o de membrana sinovial caprina (MSC), tendo CAEV apresentando replicação satisfatória, tanto em células de baixa passagem (5<sup>a</sup> a 7<sup>a</sup>) como de alta (17<sup>a</sup> a 18<sup>a</sup>), produzindo ECP típico. A formação destes sincícios parece ser resultado da interação entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores presentes na membrana celular da célula hospedeira (LEROUX et al., 1995).

Com base neste comportamento observado, pode-se concluir que as células epiteliais de córnea apresentam os requisitos para permissividade à infecção pelos LVPR: presença de receptores específicos, responsáveis pela adsorção, e disponibilidade de fatores celulares para transcrição viral (HUSO et al., 1988; LEROUX et al., 1995). A amostra CAEV utilizada replicou-se em células terminalmente diferenciadas ou ativadas, independentemente do processo de divisão celular (NARAYAN e CLEMENTES, 1989).

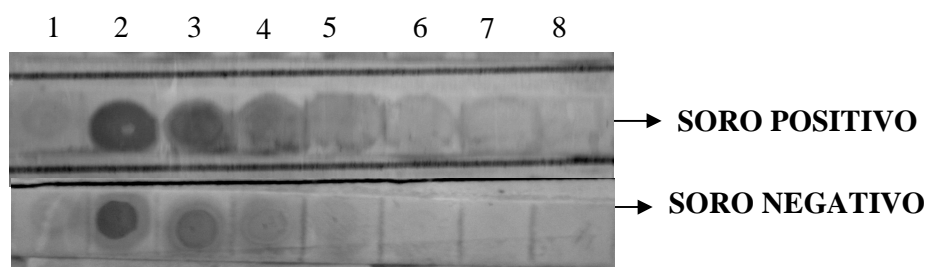
### **Produção e avaliação do antígeno**

O antígeno produzido apresentou concentração protéica média de 0,48mg/ml. Quando submetido ao SDS-PAGE foram visualizados polipeptídeos virais de diversos tamanhos (dados não apresentados). Por ser um detergente aniônico forte, o SDS quebra as pontes dissulfídicas e de hidrogênio das proteínas, que assumem comportamento de polímeros não estruturados carregados negativamente, permitindo a separação das subunidades polipeptídicas durante a corrida eletroforética (WATSON et al., 2006). SIMARD e BRISCOE et al. (1999a) observaram que concentrações superiores a 0,25% de SDS embora permitam uma melhor visualização das subunidades protéicas, promovem perda de reconhecimento de epitópos pelos anticorpos, não sendo recomendada a utilização de concentrações superiores a 0,25% na preparação de antígenos.

O *dot-blot* tem sido considerado um teste atrativo para a aplicação no diagnóstico de rotina de lentivirose de pequenos ruminantes (LVP), em virtude dos procedimentos permitirem a realização de dezenas de ensaios em membrana de nitrocelulose para detecção

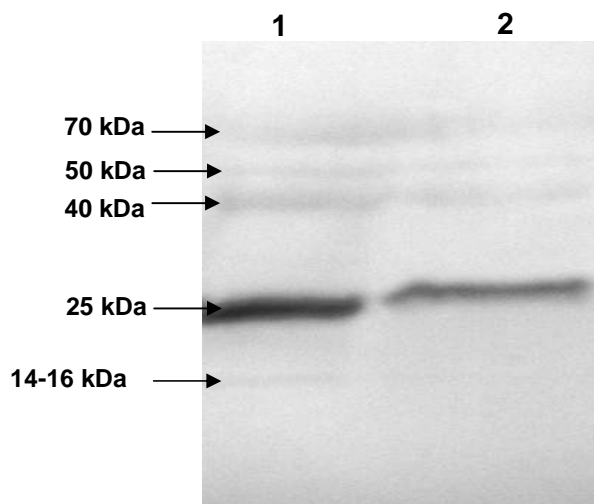
de anticorpos com alta sensibilidade e especificidade (PINHEIRO et al., 2001). Além disso, tem se mostrado útil como auxiliar na padronização do WB (ÖZYÖRÜK et al., 2001).

No processo de padronização, a escolha dos diluentes e o estabelecimento da diluição dos reagentes é um ponto crucial. No *immunoblot*, a detecção dos anticorpos pode ser influenciada tanto pela qualidade quanto pela quantidade do antígeno utilizado. Com a realização do *dot-blot* foi possível estabelecer a diluição de uso do antígeno (1/4), do soro (1/400) e do conjugado anti-cabra peroxidase (1/100) (Figura 1). Estas condições, após avaliação nas concentrações imediatamente superior e inferior, também se mostraram ideais no WB.



**Figura 1** – Resultado do *dot-blot* utilizando os soros padrão positivo e negativo (1/400) e conjugado anti-cabra peroxidase (1/100). Em 1) controle negativo do antígeno; 2) antígeno puro; 3 a 8) antígeno diluído 1/2 a 1/64.

No *immunoblot*, quando as fitas de nitrocelulose foram incubadas com o soro padrão positivo foram observadas nitidamente reações a cinco proteínas virais, com pesos moleculares (em kDa) de 70, 50, 40, 25 e 14-16, respectivamente (Figura 2); nenhuma reação no soro padrão negativo foi evidenciada. Estas proteínas têm sido descritas como reativas em outros trabalhos (ZANONI et al., 1989; HOUWERS e NAUTA, 1989; HECKERT et al., 1992; BRODIE et al., 1992; ROSATI et al., 1994; VAREA et al., 2001). Adicionalmente, observou-se discreta reação à uma proteína de 14 a 16 kDa no *immunoblot* com o antígeno diluído 1/2. Esta proteína tem sido descrita como sendo de matriz (MA), já detectada em outros estudos realizados utilizando soro de ovinos (HOUWERS et al. 1989; ZANONI et al., 1989; KAJIKAWA et al., 1990; ROSATI et al., 1994; VAREA et al., 2001).



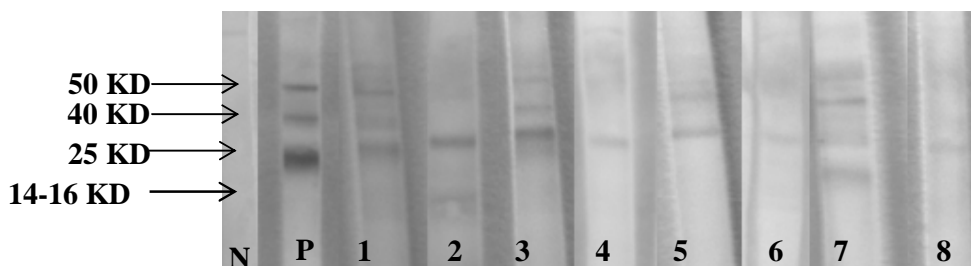
**Figura 2** – Resultado do *western blot* mostrando reação positiva a quatro proteínas virais de pesos moleculares (em kDa) de 70, 50, 40, 25 e 14-16. 1) antígeno diluído 1/2; 2) antígeno diluído 1/4.

A reação do soro padrão positivo mais intensa foi contra um polipeptídeo de aproximadamente 25 kDa, que é identificado como sendo a proteína interna de capsídeo (CA), a mais abundante do vírus e que estimula uma forte resposta humoral durante a infecção (HOUWERS e NAUTA, 1989; JOAG et al., 1996). Um segundo polipeptídeo, de 40 kDa, identificado como uma glicoproteína transmembranar (gp40-TM) (COFFIN et al., 1996), apresentou reação positiva também nos ensaios descritos por ZANONI et al. (1989); esta proteína é citada por ROSATI et al. (1995) como importante marcador imunológico nas infecções por CAEV. A banda protéica de 50 kDa é possivelmente um precursor do gene *gag* Pr50<sub>gag</sub> (JOAG et al., 1996) e neste estudo apresentou uma discreta reação frente ao soro padrão positivo. Foi ainda visualizada reação positiva a uma proteína de 70 kDa descrita como sendo uma glicoproteína de superfície (gp70), possivelmente produto da clivagem da glicoproteína de superfície (gp135) (HOUWERS e NAUTA, 1989; HECKERT et al., 1992). A intensidade das reações entre o soro padrão e as cinco proteínas, foi variável, observando-se maior intensidade na reação com o polipeptídeo de 25 kDa, provavelmente pela sua abundância (Figura 2).

Outros estudos têm demonstrado o reconhecimento de uma proteína de peso molecular de 135 kDa (gp135-SU) (HOUWERS e NAUTA, 1989), não observado neste trabalho. A ausência de reação a esta proteína pode ser devido à redução na reatividade das proteínas glicosiladas nas condições do *immunoblot* (HOUWERS e NAUTA, 1989), ou ainda, como

conseqüência dos processos de purificação de antígeno, pois as partículas virais podem perder o antígeno de envelope, principalmente, quando se utiliza gradiente contínuo de sacarose (KAJIKAWA et al., 1990; BRODIE et al., 1992).

Ao se realizar o *immunoblot* em oito amostras de soros de caprino, de campo, positivos na IDGA, observou-se que, todos os animais apresentaram reação positiva a pelo menos uma proteína. Dois animais apresentaram reação positiva à p16 ou p14, e dois a gp50, estas reações ocorreram com baixa intensidade. Ao polipeptídeo de 25 kDa todos os animais reagiram, com intensidade variável. Reação positiva a gp40 foi observada em quatro animais, com intensidade de reação discreta em três animais (Figura 3). Os soros padrão positivo e os soros de campo, neste ensaio, não reconheceram a proteína de 70 kDa, isto poderia ser explicado pela falha na transferência desta proteína para a membrana de nitrocelulose, porém, como os géis foram corados por sais de prata após a transferência, e nenhuma banda protéica foi corada pode-se afirmar que a transferência dos polipeptídeos virais foi completa.



**Figura 3** – Resultado do *immunoblot* realizado com oito amostras de soro caprino, positivos para lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) na imunodifusão em gel de agar (IDGA). Em N) Soro padrão negativo P) Soro padrão positivo; 1 a 8) Amostras de soro caprino positivos na IDGA.

Pelo exposto pode-se concluir que o *western blot* é uma técnica que têm potencial emprego no diagnóstico de LVPR, precisando ser mais amplamente avaliada, uma vez que é a prova confirmatória, preconizada pelo PNVCLVPR. O protocolo empregado para purificação de antígenos foi satisfatório, rendendo uma concentração de proteína igual à obtida em outros estudos, porém é necessário que estudos de viabilidade de seu uso em outros ensaios imunoenzimáticos, sejam realizados.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado de Michele Moreira Martins de Oliveira. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio financeiro.

## **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**. v.18, n. 2, p.57-60, 1998.

ARCHAMBAULT, D.; EAST, N.; PERK, K.; DAHLBERG, J.E. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 26, n.5, p. 971-975, 1988.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Nº 103, DE 07 DE DEZEMBRO DE 2004. Submete à consulta pública, por um prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da data da publicação desta Portaria, o Projeto de Instrução Normativa e seus Anexos, que aprova o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Lentivirose de Pequenos Ruminantes. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10453>. Acessado em 04/04/2006.

BRODIE, S.J.; PEARSON, L.D.; SNOWDER, G.D. et al. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. **Archives of Virology**, v. 130, p. 413-428, 1992.

CASTRO, R. S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas. 1998. 132 f. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CALLADO, A.K.C. Caracterização preliminar da infecção de células de membrana sinovial por amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes. **Tese** (Curso de Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes), Fortaleza, 50p., 1999.

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

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.

CELER Jr, V.; CELER, V.; NEMCOVA, H.R. et al. Serologic diagnosis of lentivirus by whole virus ELISA and AGID test. **Journal of Veterinary Medicine – Series B**, v. 45, p. 183-186, 1998.

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

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.

HOUWERS, D.J., GIELKENS, A.L.J., JAN SCHAAKE, Jr. J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. **Veterinary Microbiology**, v.7, p.209-219, 1982.

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.

HUSO, D.L.; NARAYAN, O.; HART, G.W. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **Journal of Virology**, v. 62, p. 1974-1980, 1988.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviruses. **In:** FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott-Raven, p. 1777-1996, 1996.

KAJIKAWA, O.; LAIRMORE, M. D.; DEMARTINI, J.C. Analysis of antibody responses to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 764-770, 1990.



- KURIEN, B. T.; SCOWELD, H. R. Western blotting. **Methods**, v. 38, p. 283–293, 2006.
- 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.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virology**, v.70, p.1617-1639, 1989.
- ÖZYÖRÜK, F.; CHEEVERS, W.P.; HULLINGER, G.A. et al. Monoclonal Antibodies to Conformational Epitopes of the Surface Glycoprotein of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Potential Application to Competitive-Inhibition Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies in Goat Sera. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 44–51, 2001.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; OLORTEGUI, C.C. Dot-Blot: alternativa para o diagnóstico da artrite-encefalite caprina (AEC). **Comunicado Técnico**,. Sobral/CNPC, n. 57, 4p., 2001.
- ROSATI, S.; KWANG, J.; TOLARI, F. et al. A comparasion of role virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodifusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. **Veterinary Research Communications**, v. 18, p. 73-80, 1994.
- ROSATI, S.; PITTAU, M.; TOLARI, F. et al. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. **Veterinay Microbiology**, v. 45, p. 363-370, 1995.
- SAMBROOK, J. e RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a labotatory manual**. 3<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 3, p. , 2001.
- SEDMAK, J.J. e GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analitical Biochemistry**, v. 79, p. 544-552, 1977.
- SHAH, C.; HUDER, J. B.; BÖNI, J. et al. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and world propagation through livestock trade. **Virology**, v. 319, p. 12-26, 2004.
- SIMARD, C. L. e BRISCOE, M. R. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Maedi-Visna Virus in Sheep I. A Simple Technique for Production of Antigen Using Sodium Dodecyl Sulfate Treatment. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 446-450, 1990a.

SIMARD, C. L. e BRISCOE, M. R. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Detection of Antibodies to Maedi-Visna Virus in Sheep II. Comparison to Conventional Agar Gel Immunodiffusion Test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 451-456, 1990b.

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.

VAREA, R.; MONLEON,E.; PACHECO, C. et al. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 13, p. 301-307. 2001.

WATSON, J.D.; BAKER, T.A.; BELL, S.P. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 5<sup>a</sup>ed. Porto Alegre: Artmed, 760p., 2006.

ZANONI, R., KRIEG, A., PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.580-582, 1989.

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



## PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA PROTEÍNA-G (ELISA-G) PARA DIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR) EM CAPRINOS

Michele Moreira M. Oliveira<sup>1</sup>, Roberto Soares de Castro<sup>2</sup>, Sheila Machado Gomes<sup>3</sup>,  
Ana Claudia Campos<sup>3</sup>, Sérgio Alves do Nascimento<sup>4</sup>

**Resumo:** Para o diagnóstico das lentiviroses de pequenos ruminantes a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) preconiza o uso da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e do ELISA. O ELISA apresenta maior sensibilidade do que a IDGA, porém existe o risco de ocorrerem resultados falso-positivos. Com o intuito de minimizar estas reações falso-positivas, foi padronizado um ELISA utilizando conjugado de proteína-G (ELISA-G), que se liga com grande afinidade às imunoglobulinas caprinas e ovinas. O ELISA-G foi padronizado partindo das condições de reação estabelecidas em um ELISA-indireto (ELISA-i), usando-se como padrão de definição de positividade e negatividade dos soros os testes de IDGA (Antígeno CAEV – IDGA; Biovetech®, Brasil) e o *western blot* (WB) associados em paralelo. Os valores da relação positivo/negativo (P/N) para os soros padrão foi significativamente superior ( $P < 0,05$ ) no ELISA-G (10,9) do que no ELISA-i (4,8). Ao testar um grupo de soros positivos e negativos, observou-se, basicamente, o mesmo comportamento, com valores de P/N, no ELISA-G de 4,68 e no ELISA-i de 3,33, demonstrando maior capacidade de discriminação no caso do ELISA-G, o que é altamente desejável em padronização de ensaios imunoenzimáticos (EIE). Este teste necessita ser validado (estimativa da sensibilidade e especificidade) com base no teste de um número significativo de amostras da população de caprinos e ovinos, representativas das diferentes condições epidemiológicas existentes no Brasil, para que possa ser utilizado no diagnóstico sorológico de LVPR em programas de controle de LVPR.

**Palavras-chave:** CAEV, ELISA-i, ELISA-G, IDGA, imunodiagnóstico, Proteína G, *western blot*, imunoblot.

---

<sup>1</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

<sup>2</sup> Professor Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52.171-900, Recife-PE. E-mail: rscastro@dmv.ufrpe.br

<sup>3</sup> Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

<sup>4</sup> Biólogo do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

**Abstract:** The world animal health organization recommends both the agar-gel immunodiffusion technique (AGID) and the ELISA for the serodiagnosis of small ruminant lentivirus (SRLV) infections. The ELISA has a higher sensitivity but is prone to false-positive results. Aiming to reduce this drawback, the standardization of a novel g-protein ELISA (G-ELISA) was performed, using conjugated protein G in place of the regular second antibody, which has a very high avidity to both sheep and goat antibodies. Sera were taken as reactive or not if similar results were obtained in AGID (CAEV antigen – AGID, Biovetech, Recife, Brazil) and western blot. The positive/negative ratio of standard sera were significantly higher in G-ELISA (10.9) than in standard ELISA (4.8) ( $P < 0,05$ ). In a second set of serum samples, however, the p/n ratio was similar between both tests (4.68 vs. 3.33). These results point toward a higher discriminative value for G-ELISA, and supports a broader evaluation with both goat and sheep sera, taken from different endemic areas in Brazil, in order to enable its future use in SRLV control programs.

**Keywords:** CAEV, ELISA-i, ELISA-G, AGID, immunodiagnostic, protein G, western blot, immunoblotting.

## INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes podem ser infectados por um grupo de vírus genericamente denominado de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), que compreende vários isolados, distribuídos em cinco grupos filogenéticos, que compartilham similaridades genética, de mecanismo de replicação, morfologia e interação biológica com os hospedeiros (SHAH et al., 2004). Os protótipos dos dois grupos principais são os vírus Maedi-Visna (MVV), também denominado Pneumonia Progressiva (OPPV) e o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), originalmente isolados de ovinos e caprinos, respectivamente. Estes vírus causam infecção caracterizada, muitas vezes, por animais soropositivos aparentemente saudáveis, assim, a sorologia tem sido o meio mais freqüentemente utilizado para o diagnóstico da infecção pelos LVPR (CALLADO et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) preconiza a utilização da imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e do ELISA no diagnóstico de LVPR. A IDGA é um teste que apresenta boa aceitação pelo baixo custo, especificidade, além da praticidade de execução, porém a leitura dos resultados requer experiência. O ELISA é mais sensível do que a IDGA, fácil de ser executado, passível de automação, o que possibilita o exame de grande número de amostras. Além disso, apresenta estabilidade dos reagentes e emprego destes em quantidades mínimas, porém requer um antígeno mais puro do que o utilizado na IDGA e uma estrutura laboratorial mais sofisticada (OIE, 2006).

No Plano Nacional de Vigilância e Controle das Lentiviroses de Pequenos Ruminantes (BRASIL, 2004a) do Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) (BRASIL, 2004b) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a IDGA é o teste de diagnóstico rotineiro para LVPR em caprinos e ovinos, sendo o *western blot*, a prova confirmatória.

No Brasil, um ELISA indireto (ELISA-i) e um *labeled avidin-biotin* ELISA (LAB-ELISA) (CASTRO et al., 1999) foram desenvolvidos. Em avaliação posterior, o LAB-ELISA demonstrou um número significativo de resultados falso-positivos (Castro<sup>1</sup> comunicação pessoal, 2007), a exemplo de outros ELISA (ZANONI et al., 1989; CORTEZ-MOREIRA et al., 2005). Em um estudo soropidemiológico de agalaxia contagiosa em ovinos causada por *Mycoplasma agalactiae*, muitos soros testados em um ELISA-i utilizando conjugado anti-ovino, apresentaram resultados falso-positivos, que foram eliminados com a utilização de conjugado proteína-G (ELISA-G) (LAMBERT et al., 1998), pois sabe-se que esta proteína se

---

<sup>1</sup> Roberto Soares de Castro. E-mail: rscatro@dmv.ufrpe.br

liga com elevada afinidade à IgG de ovinos e caprinos (AKERSTROM et al., 1985). Desta forma, disponibilizar um ELISA-G para diagnóstico de LVPR seria interessante para minimizar os riscos de reações inespecíficas, com a vantagem adicional em relação ao ELISA-i de poder testar simultaneamente amostras de ambas espécies. Pelo exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de padronizar um ELISA-G para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR).

## MATERIAL E MÉTODOS

O ELISA-G foi padronizado partindo das condições de reação estabelecidas em um ELISA-i, usando-se como padrão de definição de positividade e negatividade dos soros, a IDGA e o *western blot* (WB). A IDGA foi realizada utilizando-se um *kit* comercial (Antígeno CAEV – IDGA; Biovetech<sup>®</sup>, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante, enquanto que o WB foi realizado com fitas de nitrocelulose sensibilizadas com antígeno CAEV, de acordo com o protocolo descrito por OLIVEIRA et al. (2007). Com base neste critério foram definidos os padrões positivo (soro positivo kit CAEV) e negativo, bem como foram selecionadas amostras (8 positivas e 10 negativas) de soro de um rebanho caprino monitorado para controle de LVPR.

Para produção de quatro partidas de antígeno empregados nos ensaios imunoenzimáticos (EIE), foram utilizadas células epiteliais de córnea cultivadas e infectadas segundo OLIVEIRA et al. (2007). Os sobrenadantes (sbn) das culturas celulares, foram coletados, congelados e descongelados três vezes, clarificados por centrifugação a 3.300g por 20 minutos a 4°C, e submetidos a protocolo de purificação de antígenos descrito por HOUWERS et al. (1982) com algumas modificações. O antígeno foi precipitado com polietilenoglicol (PEG) 8.000 a 40% (p/v) em solução salina fosfatada (PBS) pH 7,6. A solução de PEG 8.000 foi adicionada lentamente, até concentração final de 10%. A precipitação transcorreu *overnight* a 4°C sob leve agitação. Em seguida o material foi centrifugado a 3.773g por 60 minutos a 4°C, o sbn foi descartado e o *pellet* ressuspense em solução tampão TRIS-NaCl-EDTA (TNE) 10mM, pH 7,4, até 0,1% do volume inicial. Este concentrado foi centrifugado em gradiente contínuo de sacarose (25%) a 21.460g por 2 horas e meia, a 4°C, e o *pellet* ressuspense em solução tampão TNE 10mM, pH 7,4. O antígeno foi tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS) até uma concentração final 0,1%, e com  $2 \times 10^{-4}$ M de *Phenylmethanesulphonylfluoride* (PMSF) e azida sódica a 1%. A concentração protéica foi estimada, utilizando soro albumina bovina (BSA) como padrão, pela técnica descrita por Bradford, modificada por SEDMAK e GROSSBERG (1977).

Os ELISA-G e ELISA-i foram padronizados de forma a se obter a maior diferença entre as densidades óticas (DO) dos soros positivo e negativo e maior rendimento dos reagentes. O conjugado anti-cabra peroxidase foi produzido segundo CASTRO et al. (1999), diluído de 1/25 a 1/3.200 e titulado utilizando IgG de cabra 1/100 a 1/400, como fase sólida, obtida pela purificação com ácido caprílico, de plasma de um animal que apresentava forte reação na IDGA.



O antígeno foi diluído (1/100, 1/200 e 1/400) e titulado frente à diluição de 1/50 de um soro caprino positivo e um negativo para LVPR, na diluição do conjugado anti-cabra peroxidase (1/400). O conjugado proteína-G<sup>1</sup> foi titulado frente ao antígeno nas diluições de 1/25.000, 1/50.000, 1/75.000, 1/90.000 e 1/100.000.

Para realização dos ELISA foram utilizadas placas de poliestireno<sup>2</sup> de 96 orifícios com alta capacidade de adsorção. O antígeno foi diluído e distribuído em solução tampão carbonato/bicarbonato (0,05M, pH9,6), e adsorvidos às placas a 37°C, em câmara úmida, por 3 horas. Após este período de incubação, as placas foram bloqueadas com soroalbumina bovina (BSA) a 2% (p/v), e incubadas em câmara úmida a 37°C, por uma hora. Em seguida os soros a serem testados foram diluídos 1/50 e distribuídos, as placas novamente incubadas nas condições anteriormente descritas, por uma hora, quando o conjugado foi adicionado na diluição de trabalho, e as placas incubadas por mais uma hora. O substrato (0,5µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ml e 0,5mg de OPD/ml) foi diluído em solução tampão citrato-fosfato (0,1M; pH 5,0) e distribuído e as placas incubadas por 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi parada pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 3N e a leitura das densidades óticas (DO) realizada com espectrofotômetro a 492nm.

Cada reagente foi distribuído no volume de 100µl por poço. Entre cada etapa as placas foram lavadas, com PBS pH 7,6 e *tween* 20 a 0,1% (PBS-T 0,1%), três vezes com incubação por dois minutos, com exceção da lavagem entre a etapa do conjugado e substrato, quando foram realizadas cinco lavagens.

Para avaliação dos ELISA foram calculadas as médias dos valores absolutos das DO de soros padrão positivo e negativo e de amostras de campo, positivos e negativos, assim classificados pelos seus resultados nos testes de IDGA e WB. Foi realizada uma análise de variância destas médias empregando-se o teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95% (REIS, 2003). A repetibilidade do teste foi verificada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV) de acordo com a OIE (2006). Para isto foram realizados cinco testes de ELISA-i e ELISA-G, em dias diferentes, utilizando seis repetições de 12 soros caprinos.

---

<sup>1</sup> Sigma, USA

<sup>2</sup> COASTAR® Corning, USA

## REULTADOS E DISCUSSÃO

Foram produzidas quatro partidas de antígeno, a partir de células epiteliais de córnea, infectadas com a amostra CAEV Cork, nas quais por volta da segunda semana pós-inoculação observou-se a formação de sincícios, caracterizados por vacuolização e células gigantes multinucleadas (HECKERT et al., 1992; SIMARD et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007). Estes antígenos tiveram concentração protéica média de 0,51mg/ml, resultado que foi superior ao encontrado por TORFASON et al. (1992), que obtiveram concentração protéica de 0,48mg/ml, quando trabalharam com antígeno Maedi-Visna K1514, replicados em células de plexo coróide ovino. Por outro lado, CASTRO et al. (1999) ao produzirem antígenos para ELISA, utilizando a amostra CAEV Cork replicada em células de membrana sinovial (MS), obtiveram concentração protéica 3,8 vezes maior (1,91mg/ml) e título do antígeno (1:400) quatro vezes maior ao obtido neste trabalho (1:100) (Tabela 1), correspondente a utilização do antígeno na concentração de 51µg, por poço. Estes resultados de rendimento em massa e de título do antígeno, inferiores aos obtidos anteriormente podem ser explicados, em parte, pela velocidade de centrifugação em gradiente de sacarose empregada neste trabalho, que foi inferior à relatada por CASTRO et al. (1999), favorecendo, possivelmente, a retenção de partículas virais sobre o colchão de sacarose e a conseqüente menor concentração protéica no precipitado.

Os títulos dos conjugados anti-cabra peroxidase e proteína-G, frente ao antígeno diluído 1/100 foram de 1:400 e 1:90.000, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1** – Titulação do antígeno e do conjugado anti-cabra peroxidase utilizando um ELISA indireto (ELISA-i)

Diluição do conjugado	Razão P/N <sup>1</sup>			
	Diluição do antígeno			
	1/50	1/100	1/200	1/400
1/400	1,20	4,80	2,99	2,03
1/800	1,10	3,74	2,38	1,77
1/1600	1,12	2,68	1,28	1,30
1/3200	1,06	1,95	1,17	1,36

<sup>1</sup> Razão entre as DO dos soros padrão positivo e negativo.

**Tabela 2** – Titulação de conjugado proteína-G empregada nos testes de ELISA-G para diagnóstico de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

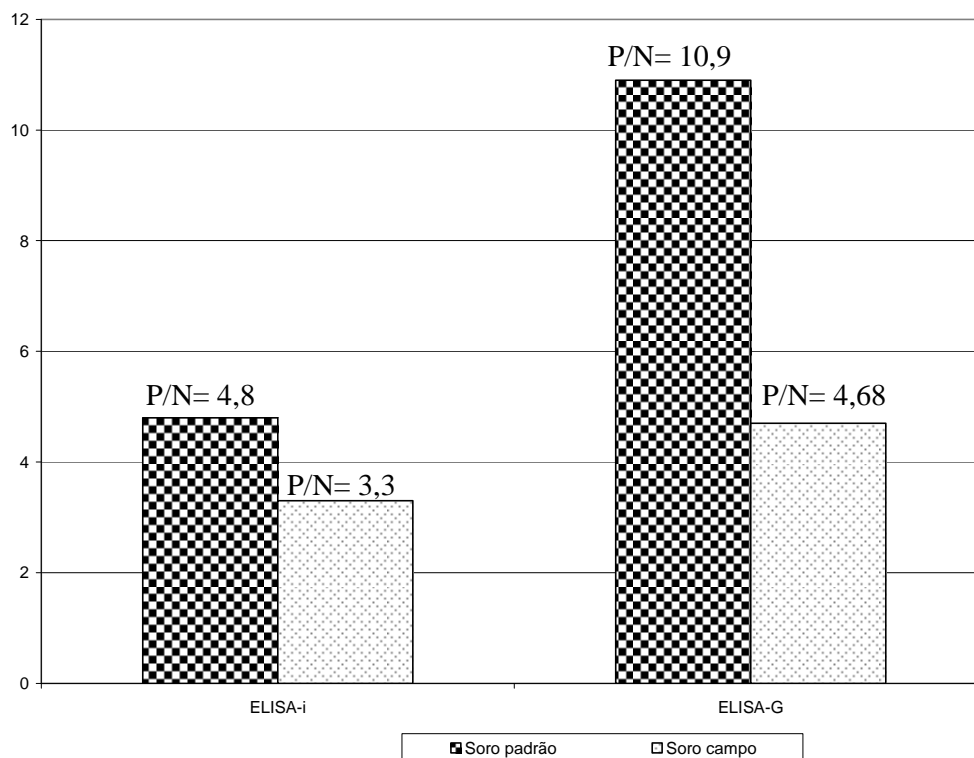
Razão P/N <sup>1</sup>					
Diluição do antígeno	Diluição do antígeno				
	1/25.000	1/50.000	1/75.000	1/90.000	1/100.000
1/100 <sup>2</sup>	6,88	7,88	9,88	10,90	6,97

<sup>1</sup> Razão entre as DO dos soros padrão positivo e negativo

<sup>2</sup> Conforme definido na titulação do ELISA-i.

Nestas condições o soro padrão positivo apresentou DO média de  $0,482 \pm 0,095$  para o ELISA-i e  $0,696 \pm 0,117$  para o ELISA-G; os negativos  $0,100 \pm 0,095$  e  $0,064 \pm 0,002$ , respectivamente. Assim, os valores da relação positivo/negativo (P/N) para os soros padrão foi significativamente superior ( $P < 0,05$ ) no ELISA-G (10,9) do que no ELISA-i (4,8). Ao testar um grupo de soros positivos e negativos observou-se, basicamente, o mesmo comportamento, com valores médios de P/N, no ELISA-G de 4,68 e no ELISA-i de 3,33 (Figura 1), demonstrando maior capacidade de discriminação no caso do ELISA-G, o que é altamente desejável em padronização de ensaios imunoenzimáticos (EIE) (OIE, 2006). Deve-se destacar que a maior diferença entre os padrões seria esperada, pois o soro padrão positivo apresenta alto título, como verificado pela sua forte reação frente ao antígeno na IDGA.

Os ELISA mostraram alta repetibilidade, com coeficiente de variação (CV), interplaca igual a 4,74% para o ELISA-G e 2,90% para o ELISA-i. Segundo a OIE (2006) CV menores que 20% demonstram que o teste apresenta a repetibilidade necessária para esta etapa de padronização do teste.



**Figura 1** – Valores da razão entre soros padrão (positivo/negativo), e soros de campo (8 positivos/10negativos), testados no ELISA-i e ELISA-G.

Embora reagindo nos EIE com o soro padrão positivo, os antígenos quando testados frente ao mesmo soro na IDGA não formaram linha de precipitação. Isto pode ter sido determinado pelo baixo título do antígeno ou por alterações físico-químicas causadas pelo tratamento com SDS dos antígenos deste trabalho, capaz de interferir negativamente na formação da linha de precipitação, pois CASTRO et al. (1999) ao testarem antígenos produzidos para uso em EIE (ELISA-i e LAB-ELISA), sem adição de SDS, frente ao soro padrão anti-CAEV de um kit IDGA comercial (Veterinary Diagnostic Technology, Inc., USA) observaram linhas fortes de precipitação entre eles.

O teste de caprinos e ovinos está preconizado no Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose em Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR), pela realização da IDGA. Como ambas as espécies são susceptíveis à infecção por LVPR, seria altamente desejável o uso de um teste para pesquisa simultânea de anticorpos anti-LVPR em ambas espécies. A IDGA tem se mostrado útil para este fim, porém seria interessante dispor de um EIE com a mesma aplicação. A utilização do conjugado de proteína-G, apresenta a possibilidade do teste

de ovinos e caprinos em uma mesma placa, uma vez que a proteína-G se liga com elevada afinidade às IgG de ruminantes (AKERSTROM et al., 1985).

De acordo com a OIE (2006), o processo de padronização e validação de uma técnica laboratorial de diagnóstico é formado, basicamente, por cinco etapas: 1) projeto; 2) escolha, otimização, padronização dos reagentes, técnicas e métodos; 3) determinação das características de desempenho do teste (sensibilidade e especificidade); 4) monitoramento contínuo de seu desempenho; e 5) manutenção e realce dos critérios de validação durante o uso rotineiro do teste. Neste trabalho foi concluída a padronização do ELISA-G. Pelos resultados obtidos, e considerando certas vantagens dos EIE, o ELISA-G necessita ser validado (estimativa da sensibilidade e especificidade), com base no teste de um número significativo de amostras da população de caprinos e ovinos, representativas das diferentes condições epidemiológicas existentes no Brasil, para que possa ser utilizado no diagnóstico sorológico de LVPR em programas de controle de LVPR.

#### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado de Michele Moreira Martins de Oliveira. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo apoio financeiro.

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AKERSTROM, B.; BRONDIN, T.; REIS, K. et al. Protein G a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **Journal of Immunology**, v.135, p.2589-2592, 1985.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Nº 103, DE 07 DE DEZEMBRO DE 2004a. Submete à consulta pública, por um prazo de 60 (sessenta) dias, a contar da data da publicação desta Portaria, o Projeto de Instrução Normativa e seus Anexos, que aprova o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Lentivirose de Pequenos Ruminantes. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10453>. Acessado em 04/04/2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 87, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2004b. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10454>. Acessado em 04/04/2006.

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

CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; RESENDE, M. et al. A Labelled Avidin-Biotin ELISA to Detect Antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis Virus in Goats Sera. **Veterinary Research Communications**. v. 23, p. 512-522, 1999.

CORTEZ-MOREIRA, M.; OELEMANN, W.M.R.; LILENBAUM, W. Comparasion of serological methods for the diagnostic of caprine arthritis-encephalitis (CAE) in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 48-50, 2005.

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.

HOUWERS, D.J., GIELKENS, A.L.J., JAN SCHAAKE, Jr. J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. **Veterinary Microbiology**, v.7, p.209-219, 1982.

LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P. et al. Detection of false-positive serum in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 70, p. 326-330, 1998.

OIE. **Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres**, 2006. disponível em: <http://www.oie.int>. acesso: dez/2006.

OLIVEIRA, M.M.O.; CASTRO, R.S.; MELO, M.A. et al. *Western blot* para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), usando protocolo simples para obtenção de antígeno. Submetido a publicação, 2007.

REIS, J.C. **Estatística Aplicada à Pesquisa em Ciência Veterinária**. Olinda, 1ª ed. 651p., 2003.

SEDMAN, J.J. e GROSSBERG, S.E. A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analytical Biochemistry**, v. 79, p. 544-552, 1977.

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.

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

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

ZANONI, R., KRIEG, A., PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.580-582, 1989.





**ANTICORPOS ANTI-LENTIVÍRUS EM CABRITOS NASCIDOS POR  
PARTO INDUZIDO ALIMENTADOS COM COLOSTRO ARTIFICIAL E  
COLOSTRO TRATADO TERMICAMENTE**

Michele Moreira M. Oliveira<sup>1</sup>, Roberto Soares de Castro<sup>2</sup>, Maria Dalva Bezerra  
de Alcântara<sup>3</sup>, Aderaldo Alcântara Farias<sup>4</sup>, Sheila Machado Gomes<sup>5</sup>, Ana Claudia  
Campos<sup>5</sup>, Sérgio Alves do Nascimento<sup>6</sup>

**Resumo:** A infecção por lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) pode ocorrer principalmente, pela ingestão de colostro e leite contaminados, e, também, através do contato íntimo entre os animais ou indiretamente pelo contato com fômites contaminados. As principais medidas de manejo empregadas no controle desta enfermidade são a separação dos cabritos de suas mães imediatamente após o nascimento, e sua alimentação com colostro artificial ou colostro de cabra ou de vaca pasteurizados. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se as medidas de manejo (nascimento por parto acompanhado, separação das mães imediatamente após o nascimento, e a administração de colostro artificial e colostro tratado termicamente) foram eficientes para evitar a transmissão de LVPR de cabras soropositivas aos seus descendentes. Para este fim, foram utilizados 44 caprinos, das raças Anglo Nubiana e Parda Alpina, nascidos por parto induzido, de mães soropositivas para LVPR, que foram separados imediatamente após o nascimento e alimentados com colostro artificial e colostro pasteurizado. Os soros foram testados pela imunodifusão em gel de agar e pelo *western blot* (WB) utilizando antígeno CAEV. Durante o acompanhamento destes animais, por um período de 14 a 18 meses, não se observou alterações clínicas compatíveis com infecção por LVPR, porém os resultados da IDGA e/ou do WB revelaram que 27,27% (12/44) dos animais, apresentavam anticorpos contra LVPR. Com base nestes resultados conclui-se que as medidas de manejo empregadas neste trabalho não foram suficientes para evitar a

---

<sup>1</sup> Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária (PPGCV/UFRPE)

<sup>2</sup> Professor Associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52.171-900, Recife-PE. E-mail: rscastro@dmv.ufrpe.br

<sup>3</sup> Pesquisadora I da EMEPA Estação Experimental de Pendência/PB

<sup>4</sup> Auxiliar técnico à pesquisa da EMEPA Estação Experimental de Pendência/PB

<sup>5</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária – UFRPE

<sup>6</sup> Biólogo do Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

infecção pelos LVPR, uma vez que, possivelmente, ocorreu infecção intrauterina, e/ou falha na inativação do vírus no colostro e leite, além da transmissão horizontal.

**Palavras-chave:** LVPR, CAEV, WB, IDGA, controle, manejo, lentivirose, colostro.

**Abstract:** The infection by small ruminant lentivirus (SRLV) may occur mainly through the ingestion of contaminated milk and colostrum, and, also, through intimate contact between the animals or indirectly through the contact with contaminated particles. The main handling measures used in this illness' control are the separation of kids from their mothers immediately after birth, and their feeding with artificial colostrum or pasteurized goat or cow colostrum. This work was developed aiming to evaluate if the handling measures (birth through accompanied labor, separation from the mothers immediately after birth, and the supply of artificial colostrum and treated termally colostrum) were efficient in avoiding the transmission of SRLV from seropositive goats to their descendents. In order to achieve that, 44 caprines were used, from the Anglo Nubian and Parda Alpina, born through induced labor, from SRLV seropositive mothers, that were immediately separated after birth and fed with artificial colostrum and pasteurized colostrum. The serums were testes through agar gel immune-diffusion and through *western blot* (WB) using the CAEV antigen. During the observation of these animals, a time period from 14 to 18 months, no clinical alterations compatible with LVSR infection were observed, however the results from the AGID and/or from the WB showed that 27.27% (12/44) of the animals displayed antibodies against LVSR. Based on these results, we draw the conclusion that the handling measures used in this work were not sufficient to avoid the infection by SRLV, given that, possibly, an intrauterine infection and/or failure to inactivate the virus in the colostrum and milk occurred, besides horizontal transmission.

**Key-words:** LVPR, CAEV, WB, AGID, control, handling, lentiviruses, colostrum.

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus Maedi-Visna (MVV) que acometem caprinos e ovinos são genericamente denominados lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), e causam infecção caracterizada por curso lento e progressivo, onde a maioria dos animais infectados não apresenta sintomatologia clínica, sendo a sorologia a forma mais adequada de diagnóstico. Caprinos e ovinos representam as únicas fontes de infecção para ambas as espécies (CALLADO et al., 2001).

A principal forma de transmissão dos LVPR é a vertical, que ocorre através da ingestão do colostro e leite contaminados, favorecida pela permeabilidade intestinal dos animais recém-nascidos (ADAMS et al., 1983; HOUWERS e VAN DER MOLEN, 1987). A infecção intrauterina pode ocorrer em, aproximadamente, 10% dos animais nascidos de fêmeas infectadas (BRODIE et al., 1994). Esta hipótese vem sendo reforçada por FIENI et al. (2003), que sugerem que a presença de células infectadas por CAEV no trato genital das fêmeas (útero e oviducto) pode ser uma fonte potencial na transmissão vertical para embriões e fetos. A transmissão dos LVPR pode ocorrer, ainda, pelo contato íntimo e prolongado entre os animais, principalmente em confinamento com alta densidade populacional, bem como pelo uso de fômites contaminados, como agulhas, tatuadores, etc (ÁLVAREZ et al., 2005). Embora DNA pró-viral de lentivírus caprino e partículas virais livres infecciosas tenham sido detectadas no sêmen de machos naturalmente infectados com CAEV (ANDRIOLI et al., 1999), a transmissão venérea ainda não foi confirmada.

No Brasil, os LVPR ocorrem em altas prevalências em rebanhos caprinos leiteiros especializados criados intensivamente. Nos rebanhos sem raça definida (SRD), criados extensivamente ou semi-intensivamente, a prevalência é baixa ou nula (CASTRO e MELO et al., 2001). Em Pernambuco a prevalência de LVPR é alta em rebanhos caprinos leiteiros (17,6%) (SARAIVA NETO et al., 1995), e baixa (3,72%) ou nula em caprinos mestiços ou SRD (OLIVEIRA et al., 2006). Como não existe tratamento e nem vacina, o controle das lentiviroses é realizado pela adoção de medidas de manejo que diminuam o risco de transmissão do vírus: separação das crias após o nascimento, evitando o contato com secreções e isolamento dos adultos; administração de colostro tratado termicamente (56°C por uma hora), de mães não infectadas ou de vaca; alimentação das crias com substituto do leite; teste dos animais a intervalos regulares e separação ou eliminação dos positivos; adoção da linha de ordenha;

controle reprodutivo, principalmente ao se utilizar reprodutores positivos; e uso de material estéril, para evitar a transmissão através do sangue contaminado (CASTRO e MELO, 2001).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou um Programa de Sanidade Caprina e Ovina (PNSCO) (BRASIL, 2004a) que contempla um Plano Nacional de Vigilância e Controle de Lentivirose de Pequenos Ruminantes (PNVCLVPR) (BRASIL, 2004b). Este Plano foi elaborado com os objetivos de controlar ou erradicar a doença, certificar criações livres, promover a educação sanitária e agregar valor aos produtos da ovinocaprinocultura. As estratégias de ação são baseadas na adoção de procedimentos compulsórios de Defesa Sanitária Animal, complementados por medidas de adesão voluntária, com ação de vigilância do serviço oficial, controle de trânsito, credenciamento de laboratórios e certificação das criações livres. As medidas propostas buscam salvaguardar o status sanitário dos rebanhos sob controle e evitar (ou minimizar) a disseminação das LVPR. As medidas obrigatórias visam estabelecer um equilíbrio dos interesses individuais nas relações entre os produtores, enquanto que as voluntárias, oficialmente reconhecidas e certificadas pelo Serviço Veterinário Oficial, visam premiar o esforço do produtor em controlar ou erradicar as doenças, agregando assim valor a seus produtos (CASTRO, 2006). Dentre as medidas de adesão voluntária está a adoção de práticas de biossegurança para o saneamento dos rebanhos para fins de certificação, baseadas em certas práticas de manejo para evitar a transmissão dos LVPR (BRASIL, 2004b).

No PNVCLVPR é preconizado para o diagnóstico de rotina de LVPR a imunodifusão em gel de agar (IDGA), devendo ser realizado o *western blot* (WB), em casos duvidosos ou para certificação das criações (BRASIL, 2004b).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar se as medidas de manejo (nascimento por parto acompanhado, separação das crias imediatamente após o nascimento, e a administração de colostro artificial e colostro pasteurizado) foram suficientes para evitar a transmissão de LVPR de cabras soropositivas aos seus descendentes.

O trabalho foi conduzido em uma criação experimental de caprinos localizada na Mesorregião do Agreste Paraibano, na microrregião do Curimataú Ocidental, onde o clima é semi-árido quente, sendo a área mais seca do Estado, com precipitações médias anuais baixas e uma estação seca que pode atingir 11 meses. A média de temperatura máxima anual é de 24,5° C e a mínima de 16,5° C. A umidade relativa do ar é em torno de 50%. A precipitação pluvial é, em média, de 400 mm/anos. A vegetação predominante é a caatinga hipoxerófila, apresentando-se

normalmente densa com porte arbóreo e com menos freqüência arbóreo-arbustiva, sendo a utilização agrícola da região bastante intensa.

Utilizou-se 44 caprinos das raças Anglo Nubiana e Parda Alpina, nascidos de mães soropositivas, de parto induzido e acompanhado. As crias foram separadas das mães imediatamente após o nascimento, receberam colostro artificial composto por leite de cabra tratado termicamente (a 56°C por uma hora), gema de ovos, açúcar e carbonato de cálcio, e colostro tratado termicamente das próprias mães. Do terceiro ao 70º dia de vida foram alimentados com leite de cabra tratado termicamente. Na segunda semana de vida receberam, também, feno de maniçoba (*Manihot glaziovii*) e concentrado a base de farelo de trigo (*Triticum* spp.), milho (*Zea mays*) e soja (*Glycine max*). A partir de 90 dias de idade permaneceram confinados recebendo concentrado (farelo de trigo, milho, soja), sal mineral para caprinos, cloreto de amônio, uréia, feno de *tifton*, palma (*Opuntia ficus indica*) e silagem de milho e sorgo (*Sorghum bicolor*). Em todo período de acompanhamento os animais foram observados clinicamente para verificação de possíveis sinais clínicos sugestivos da infecção por LVPR, tais como: desenvolvimento de artrite, distúrbios nervosos ou respiratórios (PUGH, 2005).

Aos 14 a 18 meses de idade os animais foram submetidos a uma sorologia para verificar o *status* sanitário quanto à possível infecção por CAEV, através da IDGA e do WB. Para isto, foi coletado sangue por venopunção jugular utilizando tubo tipo *vacutainer* sem anticoagulante. A IDGA foi realizada utilizando o *kit* comercial<sup>1</sup> seguindo as recomendações do fabricante, e o WB utilizando antígeno CAEV segundo protocolo descrito por OLIVEIRA et al. (2007). Os animais foram classificados como positivos quando reagiram a pelo menos um dos testes.

Durante o acompanhamento dos animais não foram observadas alterações clínicas compatíveis com a infecção por LVPR. Na IDGA realizada após o nascimento nenhum dos animais demonstrou anticorpos anti-LVPR, entretanto aos 14 e 18 meses, a IDGA e o WB realizados, revelaram que 27,27% (12/44) dos animais apresentavam anticorpos contra LVPR, contrariando o que se esperava com a adoção das medidas de manejo descritas: taxa de infecção baixa ou nula. Diante desses resultados é essencial uma reflexão sobre as medidas tradicionalmente preconizadas para o controle dos LVPR, em consonância com o conhecimento sobre as formas de transmissão e vias de infecção, bem como seu papel relativo. Resultados de outros trabalhos similares corroboram esta necessidade. Em um estudo realizado com crias

---

<sup>1</sup> Antígeno CAEV – IDGA; Biovetech®, Brasil

separadas das mães, imediatamente após o nascimento, e que receberam colostro de fêmeas soronegativas pasteurizado e leite de cabra pasteurizado, foi observado nos resultados da IDGA associados aos da PCR, taxa de soroconversão de 23%, após doze meses do nascimento (MODOLO et al., 2007). Estudo prospectivo com marrãs leiteiras até, aproximadamente, 18 meses de idade, que foram separadas das mães após o nascimento e alimentadas com colostro pasteurizado, revelou que 28,8% apresentavam anticorpos anti-LVPR, através do teste de ELISA (CASTRO et al., 2002). Em animais recém-nascidos de cabras soropositivas, foi observada uma taxa de soroconversão em 5% dos animais com idade de 8 semanas, provavelmente estes animais foram infectados antes ou durante o parto (EAST et al., 1983). Soroconversão de 10% foi observada por MACKENZIE et al. (1987) em animais segregados das mães e alimentados com colostro de cabra pasteurizado e leite em pó de vaca. Segundo os autores os animais que foram alimentados com o leite em pó tiveram contato com animais infectados através de uma cerca.

Os animais positivos deste estudo poderiam ter sido infectados verticalmente pela via intrauterina, conforme descrito por BRODIE et al. (1994) e/ou pela via digestiva através da ingestão do colostro ou leite contaminados devido a falhas no processo de pasteurização dos mesmos, pois é bem conhecido que uma das principais formas de transmissão dos LVPR se dá através da via oral pela ingestão de leite e colostro contaminados (ELLIS et al., 1986; ÁLVAREZ et al., 2005), por ser o período em que existe maior permeabilidade intestinal (HOUWERS e VAN DER MOLEN, 1987). Depois de infectados esses animais poderiam ter passado a servir como fonte de infecção para os demais, que contrairiam a infecção por contato direto, à exemplo do que foi observado por EAST et al. (1983), que registraram um acréscimo de 10% na taxa de soroconversão em animais soronegativos postos em contato íntimo com infectados.

Considerando as condições edafo-climáticas e a disponibilidade de área nesta região, não seria recomendável intensificar precocemente a criação dos animais de reposição, que deveriam ser submetidos à, pelo menos, um teste sorológico antes de entrar em reprodução, seguido de outros em períodos críticos, como metade e final da primeira lactação, conforme preconizado por CASTRO et al. (2002).

Em condições de campo, nem sempre é possível lograr sucesso na execução de um programa de controle que envolve a adoção de medidas de manejo como as descritas neste trabalho, uma vez que é essencial sua rigorosa observância durante longos períodos. Assim, o

programa torna-se passível de falhas que podem comprometê-lo de forma irreversível (CASTRO et al., 1994).

Com base nestes resultados conclui-se que as medidas de manejo empregadas neste trabalho não foram suficientes para evitar a infecção pelos LVPR de crias de cabras soropositivas, uma vez que, possivelmente, ocorreu infecção intrauterina e/ou falha na inativação do vírus no colostro e leite, além da transmissão horizontal.

### **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado de Michele Moreira Martins de Oliveira. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo suporte financeiro.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

ÁLVAREZ, V.; ARRANZ, J.; DALTABUIT-TEST, M. et al. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 78, p. 237-243, 2005.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. et al. Detecção of DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-423, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 87, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2004a. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Sanidade dos Caprinos e Ovinos. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis->

[consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10454](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10454). Acessado em 04/04/2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Nº 103, DE 07 DE DEZEMBRO DE 2004b. Submete à consulta pública, por um prazo de 60

(sessenta) dias, a contar da data da publicação desta Portaria, o Projeto de Instrução Normativa e seus Anexos, que aprova o Plano Nacional de Vigilância e Controle das Lentivirose de Pequenos Ruminantes. Disponível em:

<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10453>. Acessado em 04/04/2006.

BRODIE, S.J.; De La CONCHA-BERMEJILLO, A.; KOENIG, G. et al. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. **Journal of Infectious Disease**, v.169, p.653-657, 1994.

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

CASTRO, R.S. Política Oficial em Sanidade Ovina no Brasil. **In: Anais.... XXXIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (CONBRAVET)**, 2006.

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; AZEVEDO, E. O. et al. Seroconversion and seroreactivity patterns of dairy goats naturally exposed to caprine arthritis-encephalitis virus in Brazil. **Ciência Rural**, v. 32, p. 603-607, 2002.

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

CASTRO, R.S. Emprego da biotecnologia da reprodução no controle da artrite-encefalite caprina: Revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 18, p. 55-68, 1994.

EAST, N.E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**.v.10, p. 251-262, 1983.

ELLIS, T. M.; CARMAN, H.; ROBINSON, W. F. et al. The effect of colostrum-derived antibody on neo-natal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, p. 242-245, 1986.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K. et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**. v.59, p.1515-1523. 2003.



HOUWERS, D.J., VAN DER MOLEN, E.J. A five-year serological study of natural transmission of maedi-visna virus in a flock of sheep, completed with post mortem investigation. **Journal of Veterinary Medicine – Series B.**, v.34, p.421-431, 1987.

MACKENZIE, R.W.; OLIVER, R.E.; ROONEY, J.P. et al.. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in a endemically infected goat herd. **New Zeland Veterinary Journal.** v. 35, p.184-186, 1987.

MODOLO, J.R.; STACCHISSINI, A.V.M.; PADOVANI, C.R. et al. PCR associated with agar gel immunodiffusion for diagnosis of viral caprine arthritis-encephalitis. **Small Ruminat Research**, 2007 (no prelo).

OLIVEIRA, M.M.M.; CASTRO, R.S.; CARNEIRO, K.L. et al. Anticorpos contra Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos e ovinos sem raça definida (SRD) em abatedouros nos municípios de São Lourenço da Mata e Paulista do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 947 - 949, 2006.

OLIVEIRA, M.M.O.; CASTRO, R.S.; MELO, M.A. et al. *Western blot* para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), usando protocolo simples para obtenção de antígeno. Submetido a publicação, 2007.

PUGH, D.G. **Clínica de Ovinos e Caprinos**. Roca, São Paulo, 2005, 513p.

SARAIVA NETO, A.O.; CASTRO, R.S.; BIRGEL, E.H.; NASCIMENTO, S.A. Estudo soropidemiológico da Artrite-encefalite Caprina em Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.15, n. 4, p.121-124, 1995.

## 5 CONCLUSÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

1. O *western blot* é uma técnica que têm potencial emprego no diagnóstico de LVPR, precisando ser mais amplamente avaliada, para seu uso em caprinos e padronizada para o teste de ovinos, uma vez que é a prova confirmatória, preconizada pelo PNVCLVPR.
2. O protocolo empregado para purificação de antígenos foi satisfatório, porém é necessário que estudos de viabilidade de seu uso em outros ensaios imunoenzimáticos, sejam realizados.
3. O ELISA-G foi padronizado, porém necessita ser validado (estimativa da sensibilidade e especificidade), com base no teste de um número significativo de amostras da população de caprinos e ovinos, para que possa ser empregado no diagnóstico sorológico de LVPR em programas de controle de LVPR.
4. A taxa de soroconversão observada no rebanho acompanhado neste trabalho, que empregou medidas de manejo que, possivelmente, minimizariam a transmissão de LVPR, permite concluir que estas medidas não foram suficientes uma vez que, possivelmente, ocorreu infecção intauterina e /ou falha na inativação de partículas virais no colostro e leite, além da transmissão horizontal.