

T636.039 69

P6342

2001

Raymundo Rizaldo Pinheiro

**VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA:
Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e *Dot-Blot*) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará.**

Tese apresentada à UFMG como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.
Área: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia
Orientadora: Aurora Maria Guimarães Gouveia

Belo Horizonte
UFMG - EV
2001

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

22/06/01

881801-11

0313-04360

P654v Pinheiro, Raymundo Rizaldo, 1960-

2001 Vírus da artrite encefalite caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará / Raymundo Rizaldo Pinheiro. – Belo Horizonte : UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

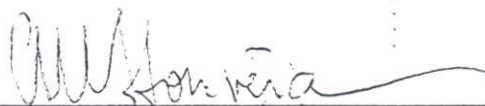
115p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Caprino – Doenças – Teses. 2. Artrite encefalite caprina – Teses. 3. Cromatografia de afinidade – Teses. 4. Epidemiologia – Teses. I. Título.

CDD – 636.390 89

Tese defendida e aprovada em 9 de março de 2001, pela Comissão examinadora constituída por:



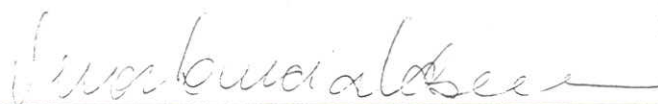
Dra. Aurora Maria Guimarães Gouveia
Orientadora




Dr. Carlos Chávez-Olórtegui



Dr. Jose Henrique Bruschi



Dra. Vera Lúcia Viegas de Abreu



Dra. Zélia Inês Portela Lobato

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida.

À minha família e em especial, a Alice, Mariana, Gabriel e Caio, pelo apoio, paciência, carinho e compreensão.

À Profa. Aurora Maria Guimarães Gouveia, pela inestimável orientação, pelas lições de vida, dedicação, confiança, amizade e exemplo de profissional a ser seguido.

Ao pesquisador Carlos Chaves Olortegui, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, e por ter me iniciado nos caminhos dos ensaios imunoenzimáticos e me despertado para a cromatografia de afinidade. E, principalmente, por ter me propiciado momentos produtivos e satisfatórios da tese.

À Profa. Zélia Lobato pela atenção, amizade e disponibilidade (sempre encontramos a porta aberta, independente do número de pessoas na pequena sala, para uma orientação segura e um norte a seguir).

Aos Professores Rômulo Cerqueira Leite e Jener Karlisson P. dos Reis pelo apoio, orientação e incentivo, principalmente nos momentos difíceis.

Ao Prof. João Paulo Haddad, meu amigo pessoal, que me ajudou em todos os momentos da análise da fase epidemiológica da tese.

À Profa. Celina M. Modena e o Prof. Antônio Maira Claret pela colaboração e valiosas sugestões.

À técnica de laboratório Creuza, pela amizade, apoio e por ter sempre procurado me transmitir, de todas as maneiras, todo o seu saber da virologia.

Às técnicas Doracy e Juliana pelos ensinamentos, amizade e colaboração.

À colega Eliane pela sua amizade, apoio e principalmente pela determinação e carinho que dedicou ao nosso trabalho.

Aos colegas Marcos e Patrícia pela ajuda e apoio nos momentos difíceis e maçantes dos cultivos celulares e produção dos antígenos.

À Nadia pela amizade e apoio em todos os momentos da tese.

À Simone Araújo, meu anjo da guarda, que me orientou, ajudou e propiciou juntamente com Daniele, Karen, Michele e Larissa, além da colaboração na execução dos trabalhos, os melhores momentos que tive durante este curso.

Ao colega Ricardo pelo apoio e ajuda sempre dedicada e eficiente.

À Mirian e Regina, da FUNED, pela amizade e palavras de apoio e conforto e, claro por aquele maravilhoso cafezinho.

À pesquisadora e chefe do setor de pesquisa da FUNED, Dra. Consuelo pelo seu espírito superior e desprendido de auxiliar, em qualquer momento.

À Dra Marta pelo seu apoio indispensável, e com certeza, sem este, esta tese não se concretizaria.

Aos meus colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração e pela amizade.

À Escola de Veterinária da UFMG pela oportunidade da realização deste curso.

À Fundação Ezequiel Dias por ceder suas instalações para a realização de parte da fase experimental, além de proporcionar um ambiente acolhedor e agradável.

À Embrapa Caprinos e UVA pelo apoio minha liberação para realização deste curso.

Ao BNB e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

À EMATERCE pela valiosa colaboração na realização deste trabalho.



SUMÁRIO

	RESUMO	13
	ABSTRACT	13
	PREFÁCIO	14
1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)	18
2.1.1	Classificação.....	18
2.1.2	Estrutura e genoma.....	18
2.1.3	Replicação.....	19
2.1.4	Tropismo	20
2.1.5	Relação antigênica.....	20
2.1.6	Heterogeneidade genética.....	21
2.2	VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV).....	22
2.2.1	Epidemiologia	22
2.2.2	Transmissão	23
2.2.3	Patogenia e resposta imune	24
2.2.4	Manifestações clínicas e características anátomo-histopatológicas	26
2.2.5	Controle e prevenção	28
2.3	DIAGNÓSTICO DOS LENTIVÍRUS DOS PEQUENOS RUMINANTES	28
2.3.1	Isolamento viral	29
2.3.2	Microscopia eletrônica (ME)	29
2.3.3	Hibridização <i>in situ</i> (HIS)	30
2.3.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	30
2.3.5	Imunodifusão em gel de ágar (IDGA)	31
2.3.6	Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	32
2.3.7	Ensaio imunoenzimático	32
2.3.7.1	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA)	32
2.3.7.2	<i>Dot-Blot</i> (<i>Dot-ELISA</i> ou <i>Dot-imunoblotting</i>)	34
2.3.7.3	<i>Immunoblotting</i> ou " <i>Western blotting</i> "	35
2.3.8	Outras técnicas auxiliares no diagnóstico	35
3	ESTUDOS EXPERIMENTAIS	37
3.1	PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA NO ESTADO DO CEARÁ-BRASIL	37
3.1.1	Introdução	37
3.1.2	Material e métodos	37
3.1.3	Resultados e discussão.....	38
3.2	ASPECTOS ZOO-SANITÁRIOS DA CAPRINOCULTURA CEARENSE	41
3.2.1	Introdução	41
3.2.2	Material e métodos	41
3.2.3	Resultados e discussão.....	42

3.3	ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS, EM CAPRINOS, CONTRA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES.....	47
3.3.1	Introdução	47
3.3.2	Material e métodos	47
3.3.3	Resultados e discussão.....	50
3.4	<i>DOT-BLOT</i> PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS, EM CAPRINOS, CONTRA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES.....	53
3.4.1	Introdução	53
3.4.2	Material e métodos	53
3.4.3	Resultados e discussão.....	55
3.5	PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO DO LENTIVÍRUS CAPRINO POR COLUNA DE AFINIDADE	59
3.5.1	Introdução	59
3.5.2	Material e métodos	59
3.5.3	Resultados e discussão.....	62
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	64
4.1	Custo de produção dos testes (IDGA, ELISA e <i>Dot-Blot</i>)	66
4.2	Perspectivas de trabalhos com os dados e/ou resultados da tese.....	66
5	CONCLUSÕES	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7	ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura do vírus da artrite encefalite caprina viral (Coffin, 1996).....	87
Figura 2 -	Organização genética dos lentivírus Maedi-Visna e Artrite Encefalite Caprina (Coffin, 1996).....	88
Figura 3 -	Ciclo de replicação dos Retrovírus (adaptado de Coffin, 1996).....	89
Figura 4 -	Municípios do Estado do Ceará segundo as macroregiões onde foi realizada a pesquisa	90
Figura 5 -	Municípios do Estado do Ceará onde foi realizada a pesquisa em caprinos para detecção de anticorpos contra CAEV.....	91
Figura 6 -	Número de matrizes, reprodutores, cabritos e novilhas segundo o regime de criação, no Ceará.....	92
Figura 7 -	Sinais clínicos em caprinos segundo o regime de criação, no Estado do Ceará.....	92
Figura 8 -	Princípios ativos de antihelmínticos utilizados em rebanhos caprinos do Estado do Ceará.....	93

Figura 9 -	Células de membrana sinovial caprina não infectada. Aumento de 250 X. Corada por cristal violeta 0,1%.....	93
Figura 10 -	Células de membrana sinovial caprina infectada com lentivírus caprino. Presença de células gigantes multinucleadas (setas). Aumento de 200X. Corada por cristal violeta 0,1%.....	94
Figura 11 -	Determinação da quantidade de antígeno e diluição do soro empregado no teste de ELISA-i para o diagnóstico de lentivírus caprino.....	94
Figura 12 -	ELISA do controle negativo, em várias concentrações, frente a soros positivos e negativos.....	95
Figura 13 -	ELISA do <i>pool</i> de soros positivos, <i>pool</i> de soros negativos e dos soros contidos no <i>kit</i> comercial (positivo, reagente e fraco positivo).....	95
Figura 14 -	ELISA - Perfil do percentual de positividade de soros controles negativos e soros positivos pelo IDGA.	96
Figura 15 -	Determinação da diluições do soro frente a cinco diferentes concentração de antígeno utilizado no <i>Dot-Blot</i> para o diagnóstico sorológico da infecção por lentivírus caprino.....	96
Figura 16 -	Determinação do tipo de bloqueio utilizado no <i>Dot-Blot</i> para o diagnóstico sorológico da infecção por LVC.....	97
Figura 17 -	Resultado final do <i>Dot-Blot</i> para o diagnóstico sorológico de LVC de um <i>pool</i> de soros positivos, fracos positivos e negativos.....	97
Figura 18 -	MIDGA do antígeno AgL1 concentrado 50 X (poço central) frente ao soro positivo do <i>kit</i> comercial (poços 1, 2, 3 e 5), negativo (poço 4) e fraco positivo (poço 6). Nos poços 1, 2, 3 e 5 verifica-se a presença de uma linha de precipitação referente à proteína p28.....	98
Figura 19 -	MIDGA do antígeno AgL1 concentrado 150x (poço central) frente ao soro positivo do <i>kit</i> americano (poços 1, 3, 4 e 5), e reagente (poços 2 e 6). Nos poços com soro positivos observa-se claramente a formação de duas linhas de precipitação frente às proteínas gp135 (interna) e p28.....	98
Figura 20 -	Picos da coluna de afinidade IgG-LVPR.....	98
Figura 21 -	Comparação, pela eletroforese e <i>immunoblotting</i> , do Ag comercial (AgK), antígeno concentrado (AgL ₁) e antígeno purificado por afinidade em coluna anti-LVPR (AgL ₁ CA).....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Polipeptídeos encontrados no CAEV segundo vários autores e no presente trabalho.....	100
Tabela 2 -	Ocorrência inicial da Artrite Encefalite Caprina em vários países, relatados por diversos autores.....	100

Tabela 3 -	Prevalência de caprinos soropositivos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em vários Estados do Brasil, relatados por diversos autores.....	101
Tabela 4 -	Diagnóstico sorológico da infecção por LVPR por MIDGA em caprinos nas diversas regiões do Estado do Ceará, 1999.....	101
Tabela 5 -	Distribuição, segundo sua procedência, dos caprinos soropositivos para infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Ceará, 1999.....	102
Tabela 6 -	Sexo, composição do rebanho, grau de sangue e tipo racial de caprinos negativos e positivos para o CAEV, no Ceará, 1999.....	102
Tabela 7 -	Números de caprinos por categoria animal nos rebanhos do Ceará.....	103
Tabela 8 -	Distribuição dos rebanhos caprinos no Ceará segundo o tipo de exploração.....	103
Tabela 9 -	Sinais clínicos que, segundo os proprietários, acometem em ordem de frequência os caprinos no Estado do Ceará.....	103
Tabela 10 -	Mortalidade de caprinos jovens e adultos em rebanhos do Estado do Ceará.....	104
Tabela 11 -	Práticas de manejo sanitário utilizadas em 127 criatórios caprinos no Estado do Ceará.....	104
Tabela 12 -	Frequência da assistência técnica aos criatórios caprinos com respectivos índices médios de mortalidade de caprinos no Ceará.....	104
Tabela 13 -	Medidas de controle da verminose utilizadas em 127 criatórios caprinos no Ceará.....	105
Tabela 14 -	Determinação do ponto de corte do ELISA-i para diagnóstico de lentivírus caprino.....	105
Tabela 15 -	Resultados de 327 amostras de soro caprino pelos testes IDGA e ELISA-i para o diagnóstico de anticorpos contra lentivírus caprino.....	105
Tabela 16 -	Comparação dos resultados de soros caprinos testados pela IDGA e pelo ELISA-i para a detecção de anticorpos contra LVPR.....	105
Tabela 17 -	Resultado, do teste de soros caprinos pelo IDGA, ELISA-i e <i>Dot-Blot</i> para o diagnóstico da infecção por LVPR.....	106
Tabela 18 -	Comparação dos resultados de soros caprinos testados pelo <i>Dot-Blot</i> e pelo ELISA-i para a detecção de anticorpos contra LVPR.....	106
Tabela 19 -	Valores estimados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, eficiência, índice Kappa e qui-quadrado (χ^2) para IDGA e <i>Dot-Blot</i> em relação ao ELISA-i de 327 amostras de soro caprino.....	106

LISTA DE ABREVIÇÕES

χ^2	Qui-quadrado
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Ag	Antígeno
AgK	Antígeno do <i>kit</i> comercial americano
AgL1	Antígeno lote 1 concentrado 50 x por ultrafiltração
AgL1CA	Antígeno purificado por coluna de afinidade
AIEV	Vírus da anemia infecciosa equina
API	Seqüência ativadora da LTR
AP4	Seqüência ativadora da LTR
BIV	Vírus da imunodeficiência bovina
CA	Coluna de afinidade
CAE	Artrite encefalite caprina
CAEV	Vírus da artrite encefalite caprina
CAP	Capsídeo
CE	Ceará
<i>c-fos</i>	Fator celular presente nos macrófagos que participa da ativação viral
<i>c-jun</i>	Fator celular presente nos macrófagos que participa da ativação viral
cm^2	Centímetro quadrado
CN	Controle negativo
CNPC	Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
CO_2	Dióxido de carbono
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DB	Dot-Blot
DFS	Dose formadora de sincício
DMVP	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ECP	Efeito citopático
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Efic	Eficiência
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMATERCE	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Ceará
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral
EPACE	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará
Espec	Especificidade
EV	Escola de Veterinária
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação
FC	Fixação de complemento
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
g	Unidade da força centrífuga relativa
<i>gag</i>	Gene viral que codifica as proteínas internas do vírus
gp	Glicoproteína
H_2O_2	Água oxigenada
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIS	Hibridização <i>in situ</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina

IN	Integrase
INCRA	Instituto de Colonização e Reforma Agrária
kDa	Kilodaltons
L	Litro
LPD	Leite em pó desnatado
LTR	Seqüências longas repetidas
LVC	Lentivírus caprino
LVO	Lentivírus ovino
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
M	Molar
MA	Matriz
MCP-1	Proteína quimioatraentes de monócitos tipo 1
ME	Microscopia eletrônica
MEM	Meio essencial mínimo
MG	Minas Gerais
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MIDGA	Micro-imunodifusão em gel de agarose
min	Minuto
mA	Mili-Ampère
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Mili-molar
MN	Membrana de nitrocelulose
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Vírus Maedi Visna
NaCl	Cloreto de sódio
NC	Nucleocapsídeo
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
°C	graus Celsius
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OPD	σ -phenylenediamine
ORF	Pequena região do genoma viral
p	Proteína
PA	Parça alpina
PBS	Solução de tampão de fosfato
PBS-T	PBS Tween-20
PCAEV	Programa de controle da artrite encefalite caprina
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Pós-infecção
PM	Peso molecular
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i>
<i>pol</i>	Gene que codifica as enzimas virais
PP	Percentual de positividade
pr	Precursor
<i>rev</i>	Gene de regulação viral
RIA	Radioimunoensaio
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RJ	Rio de Janeiro
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro

RNAt	RNA transportador
rpm	Rotação por minuto
RU3	Região única não traduzida na extremidade 3'
RU5	Região única não traduzida na extremidade 5'
SA	Saanen
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Sens	Sensibilidade
SFB	Soro fetal bovino
SI	Semi-intensivo
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SRD	Sem raça definida
SU	Glicoproteína de superfície
<i>tat</i>	Gene de regulação viral
TCID	Tissue culture infectious doses
TM	Glicoproteína transmembrânica
TNE	Tampão
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Transcriptase reversa
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFBA	Universidade Federal da Bahia
<i>vif</i>	Gene de regulação viral
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

RESUMO

Para um melhor conhecimento e conseqüentemente implantação das medidas de controle da artrite encefalite caprina viral no Ceará foi realizado o levantamento epidemiológico com ênfase nos rebanhos que apresentam algum grau de melhoramento e nos rebanhos nativos/SRD, e um estudo do manejo sanitário empregado nos criatórios caprinos evidenciando os problemas sanitários mais relevantes. Constatou-se que o CAEV não encontra-se disseminado nos rebanhos SRD/Nativo do Ceará, entretanto já se encontra presente em várias regiões, principalmente nas bacias leiteiras do estado, e que os reprodutores são mais afetados o que pode representar, em decorrência das práticas comuns de aquisição (troca ou empréstimo), papel importante na disseminação da enfermidade nos criatórios. Verificou-se, ainda, que a grande maioria dos criadores de caprinos no Estado do Ceará realizam uma criação de subsistência e exploram basicamente carne/pele e que o manejo sanitário dos caprinos destes criatórios é precário, independente do tipo de exploração ou regime de criação, com mortalidade de animais considerada alta, principalmente de jovens. Adicionalmente objetivou-se padronizar um ELISA indireto utilizando antígenos do vírus total para o diagnóstico da CAE e comparar com a IDGA comercial, desenvolver e validar um teste *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico da CAE e testar a purificação das proteínas dos LVPR através da utilização de coluna de afinidade. O ELISA padronizado mostrou-se um teste mais sensível que a IDGA podendo ser indicado para utilização no controle dos LVPR. O teste *Dot-Blot* apresentou sensibilidade semelhante ao ELISA indireto na detecção de anticorpos contra os LVPR, e pela rapidez, facilidade de execução, eficiência e pouco custo, é um teste de eleição para ser empregado em locais de grande movimento e comércio de pequenos ruminantes tais como: exposições, feiras, concursos, e outros. Quanto ao uso da cromatografia de afinidade na purificação de proteínas dos LVPR concluiu-se ser a mesma uma alternativa viável para produção de antígeno purificado de LVPR.

Palavras-Chave: lentivírus, CAEV, caprino, epidemiologia, doenças, Ceará, ELISA, *Dot-Blot*, cromatografia de afinidade.

ABSTRACT

For a better knowledge and consequent implantation of the control measures for the arthritis encephalitis caprine in the state of Ceará an epidemic study was accomplished with emphasis in the flocks that have some genetic improvement and the native/SRD. A study of the health management used in the goat farms showing the more relevant sanitary problems was also done. It was verified that CAEV is not disseminated in the native/SRD flocks in the state of Ceará, however it is already present in several areas, mainly in the milk production regions of the state. The bucks are more affected ($P < 0,05$) and can act, due to the practices commonly used, of changes or loan, an important paper in the transmission to the native/SRD flocks. It was also verified that the great majority producers of the caprine in the state of Ceará State explore their animals for meat/skin basically and that the sanitary handling of the animals of these farms is precarious, independent of the exploration type or system. Mortality of animals mainly youths, is considered high, committing the development of the activity. Another purpose of this work was to standardize an indirect ELISA using antigens of the whole virus for the diagnosis of CAE. Another thing was to develop and to validate a *Dot-Blot* test for the CAE serological diagnosis and to test the purification of the proteins of LVPR through the use of affinity chromatography. ELISA was shown to be more sensitive than IDGA being indicated for use in the control of LVPR. The *Dot-Blot* presents sensibility similar to indirect ELISA for the detection of antibodies against LVPR, because of the speed, execution easiness, efficiency and little cost, it is an election test to be used in places of great movement and trade of small ruminant such as: exhibitions, fairs, shows, etc. The use of affinity chromatography in the purification of proteins of LVPR indicated it as a viable alternative for production of purified antigen of LVPR.

Keywords: lentivirus, CAEV, goat, epidemiology, disease, Ceará, ELISA, *Dot-Blot*, affinity chromatography.

PREFÁCIO

De onde viemos e para onde vamos

A partir de 1976, importações de caprinos de raças exóticas, procedentes de vários países, buscaram a introdução de potencial genético leiteiro, tendo ocorrido também a efetiva introdução de agentes infecciosos no Brasil pela importação de caprinos sem adequados critérios sanitários, com conseqüente dispersão de doenças infecciosas entre os rebanhos nacionais, dentre elas a CAE - artrite encefalite caprina. O caráter degenerativo crônico da doença, associado às práticas coletivas de manejo, comuns nas criações destinadas à produção de leite, proporcionou sua dispersão pelo País, tornando-se fundamental o estabelecimento de medidas de controle adequadas.

Com início em 1991, pesquisas vêm sendo desenvolvidas no Laboratório de Virologia Animal do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG, voltadas ao diagnóstico e controle da CAE: Assis 1994 (Tese - Mestrado - DMVP/EV-UFMG), Figueiredo 1995 (Tese - mestrado - DCC/EV-UFMG), Castro 1998 (tese - doutorado - DMVP/EV-UFMG), Coelho 1999 (Tese - Mestrado - DCC/EV-UFMG), Yorinori, 2001 (Tese - Mestrado - DMVP/EV-UFMG).

A ocorrência da CAE no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (CNPC) - Embrapa motivou a elaboração e implantação, a partir de 1994, do **PCAEV**-Programa de Controle da CAE (Embrapa, 1994), de forma interinstitucional em parceria com o DMVP-EV-UFMG, estabelecendo e avaliando medidas sanitárias e de manejo planejadas estrategicamente dentro do conceito de Saúde Integrada, visando o controle gradual da lentivirose no rebanho de caprinos e ovinos do CNPC em Sobral (CE), e a elaboração e divulgação nacional de programas sanitários específicos para as distintas modalidades epidemiológicas encontradas no rebanho do CNPC as quais refletem a diversidade encontrada nos rebanhos nacionais em geral, variando de livres de infecção, a de baixa prevalência, e de média a alta prevalência.

As medidas de controle baseiam-se no bloqueio da transmissão do vírus a partir de animais infectados, considerando as vias de infecção conhecidas e as que na época apresentavam-se pouco esclarecidas, e ainda, fatores como soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica, replicação restrita, manejo do rebanho e limitações na disponibilidade comercial de testes mais sensíveis (testes imunoenzimáticos e biomoleculares).

Procurou-se, inicialmente, minimizar o contato entre animais soropositivos e soronegativos, que foram separados e identificados. Para o monitoramento sorológico das medidas de controle optou-se pela técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), em função da disponibilidade do imunoreagente comercial, maior facilidade de implantação imediata e treinamento da equipe, e considerou-se que a sensibilidade da prova seria adequada aos objetivos iniciais de controle.

As medidas sanitárias surtiram bom efeito, com redução gradativa das taxas e tendência de estabilização em patamares baixos (0,5 a 2,1 %), indicando a presença de falsos-negativos que a IDGA não consegue detectar (Embrapa, 1996). Técnicas imunoenzimáticas com sensibilidade maior que a IDGA foram previstas para a segunda etapa do **PCAEV** com repetição semestral, mas a inexistência de *kits* comerciais no mercado nacional, apresentou-se como entrave para o avanço do Programa.

Associando técnicas virológicas clássicas e elegantes técnicas imunoenzimáticas, a presente dissertação compõe parte integrante do **PCAEV**, e buscou disponibilizar técnicas sorológicas mais sensíveis e de custo compatível com a realidade nacional, utilizando antígeno produzido inicialmente no DMVP-EV-UFMG para a validação comparativa no rebanho do CNPC, tornando possível que, ao final do decênio 1994-2003, o **PCAEV** tenha alcançado seus objetivos, com a permanência dos resultados negativos em quatro testes semestrais consecutivos, e tenham sido alcançadas as metas gerais previstas: produção dos imunoreagentes em parceria com a iniciativa privada, de forma a disponibilizá-los, para que possam ser utilizados como apoio ao Programa Nacional de Controle da CAE, que vem sendo elaborado com base na experiência de uma década de observação experimental.

A determinação dos níveis tecnológicos e caracterização da caprinocultura cearense aqui apresentada, em conjunto com as informações relativas à caprino-ovinocultura em Minas Gerais, atualmente em andamento, tornará possível ao Grupo de Pesquisas em Pequenos Ruminantes (GPPR), hoje composto

por pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Saúde Animal da EV-UFMG, Embrapa Caprinos e Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA através de sua recém criada Divisão de Pequenos Ruminantes, contando com o apoio da Associação de Criadores de Caprinos e Ovinos de Minas Gerais - CAPRILEITE, a edição do Manual de Manejo Sanitário de Pequenos Ruminantes, o qual apresentará de forma acessível ao produtores de uma forma em geral, buscando o perfeito equilíbrio alcançado com a associação de entidades de pesquisa, de ensino e de produtores.

Prof^ª. Dra. Aurora M. G. Gouveia
Professora da Escola de Veterinária da UFMG
Consultora Embrapa Caprinos
Coordenadora do Grupo de Pesquisas em Pequenos Ruminantes – GPPR-NPSA

INTRODUÇÃO

A partir de 1978, importações de caprinos de raças leiteiras exóticas, procedentes de vários países da Europa (França, Suíça, Alemanha, Holanda, Inglaterra) e América do Norte (Estados Unidos e Canadá) buscaram a introdução de material genético leiteiro em animais puros ou de seus cruzamentos com mestiços de raças nativas brasileiras. Esta atividade vem se desenvolvendo rapidamente tornando-se cada vez mais importante na geração de recursos nacionais. Com um rebanho caprino leiteiro aproximado de 40.000 cabeças (aproximadamente 14.000 fêmeas em lactação/ano), a produção de leite caprino no Brasil é de 4,5 mil toneladas/ano, destacando-se a região Sudeste como maior produtora (65%) seguida pelas Regiões Nordeste (26%), Centro-Oeste (6%) e Sul (3%) (Silva, 1996).

O surgimento de novas formas organizacionais tem aumentado a demanda de pesquisas, buscando agregar valores e incorporar tecnologias que possam suprir a:

- Demanda crescente do mercado consumidor de leite de cabra pasteurizado, bem como de seus produtos incluindo-se o leite em pó, que, em face de sua praticabilidade, apresentou em 1995 e 1996, crescimento superior a 110% nas importações oriundas dos EUA (Silva, 1996);
- Necessidade de redução do alto custo de produção (em média R\$ 0,75 a R\$ 1,10 por litro) (Silva, 1996);
- Ocorrência de efetiva introdução de agentes infecciosos no Brasil através da importação de caprinos sem adequados critérios sanitários e conseqüente dispersão de doenças infecciosas entre os rebanhos com elevação dos gastos com medicamentos e com adoção de medidas terapêuticas e de controle (Assis, 1994);
- Potencialidade do Brasil e, em especial, da Região Sudeste, como exportador de material genético caprino sanitariamente adequado para o eminente nicho de mercado do MERCOSUL (Ribeiro, 1993; Silva, 1996).
- Levantamentos sorológicos nas diversas regiões brasileiras têm indicados altos índices de soropositividade para LVPR, em caprinos de raças puras exóticas leiteiras, necessárias para a

formação dos rebanhos mestiços leiteiros a partir dos cruzamentos absorventes com caprinos de raças nativas ou sem raça definida (SRD).

Silva (1996) analisou o sistema agro-industrial da caprinocultura leiteira no Brasil, bem como seus principais estrangulamentos tecnológicos e não tecnológicos nos seus diversos segmentos: processamento, produção, insumos e pesquisa. Segundo o autor, o problema sanitário de maior relevância ainda é a verminose, seguida da artrite encefalite caprina (CAE).

De acordo com as resoluções 65/94 e 66/94 do Mercosul, os países membros do bloco devem certificar-se, em caso de exportação e importação de ovinos e caprinos, que o país de origem dos animais seja livre de Maedi-Visna e de CAE há pelo menos três anos. Estas normas sanitárias salientam a importância econômica do controle e erradicação destas enfermidades (Ribeiro, 1993).

A criação de caprinos no Brasil tem crescido nos últimos anos, principalmente devido à importância terapêutica do seu leite, e ao estímulo ao consumo de sua carne e de leite, mas pouca ênfase é dada ao controle de doenças infecciosas, especialmente a CAE. Esta enfermidade tem se disseminado pelo País em grande parte devido ao desconhecimento do grau de comprometimento dos rebanhos e da dificuldade de acesso ao diagnóstico. Estudos para o esclarecimento destes problemas esbarram na falta de dados relativos ao número e localização de criatórios caprinos não registrados e, portanto, desconhecimento do real número de criadores.

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) - vírus Maedi-Visna (MVV) e vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) são complexos e não oncogênicos. O CAEV infecta caprinos de diferentes raças, idades e sexo, com quadros clínicos de leucoencefalomielite em cabritos e artrite crônica, mamite e pneumonia em adultos. Desta forma, as perdas econômicas se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea, do período de lactação e perda de peso devido à dificuldade de locomoção, redução do peso ao nascer e da taxa de crescimento (Greenwood, 1995). Uma perda econômica expressiva é oriunda do abate prematuro de animais em fase de alta produção.

Além disto, os reprodutores com graves problemas articulares tornam-se incapazes de realizar a monta ou mesmo de responderem a colheita de sêmen por vagina artificial. Segundo Le Guillou (1989), os animais com mamite por CAEV tem perda de até 100 litros de leite por período de lactação. Se por um lado a manutenção de animais infectados no rebanho representa sérias perdas econômicas, o sacrifício de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, pois grande parte do rebanho pode estar acometida, além de representar perda de material genético. Desta forma, tem sido implantados programas de controle visando a obtenção de crias destes animais enfermos antes de descartá-los (Gouveia et al., 1994). Além destes prejuízos a presença de animais enfermos por LVPR reduz o comércio e o trânsito de pequenos ruminantes entre países livres e países onde a infecção é endêmica (Ribeiro, 1993).

A detecção precoce e a remoção dos animais infectados dos rebanhos são à base do sucesso dos programas de controle (Embrapa, 1994; Gouveia et al 1994; Rowe & East, 1997). A identificação dos animais infectados por LVPR é feita de forma indireta utilizando testes sorológicos, sendo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) com antígenos de origem ovina e caprina, o teste comumente empregado (Knowles, 1997). A IDGA é o teste recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para diagnóstico dos LVPR, o qual além de prático tem baixo custo e boa especificidade (OIE, 1996). Entretanto, segundo Hanson et al., (1996) os animais infectados por estes vírus podem apresentar soroconversão tardia e variação nos níveis de anticorpos durante a vida, o que reduz a sensibilidade, e tem implicação direta no sucesso de programas de controle.

A eficiência de programas de controle das LVPR depende da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização em animais de um determinado rebanho e do manejo utilizado neste mesmo rebanho. A grande variabilidade antigênica e genética dos LVPR (Rosati et al., 1995; Leroux et al., 1997; Marchesin, 1997; Pasick, 1998; Zanon, 1998; Castro, 1998) induz à necessidade do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico dos LVPR, para que possa reduzir o número de resultados falsos-negativos. O *Dot-Blot* é um

teste atrativo para aplicação de rotina em virtude dos procedimentos permitirem a realização de dezenas de ensaios em tira de nitrocelulose com alta sensibilidade para detectar anticorpos.

A pouca informação sobre esta enfermidade no Brasil e, principalmente no Ceará, tem limitado a implantação de medidas profiláticas. O levantamento epidemiológico é o primeiro passo para o controle da CAE. Com base nestes dados serão desenvolvidos e implantados programas de controle no combate a esta enfermidade. Em virtude da disseminação da CAEV no País, associações, criadores e órgãos oficiais devem buscar rapidez e qualidade nas informações, que possibilitem uma vigilância epidemiológica efetiva, adoção de medidas profiláticas adequadas e maior controle no trânsito, comercialização e importação de animais. Estes fatos aliados à presença de um número significativo de resultados falso-negativos no teste de IDGA e a necessidade de equipamentos caros para a realização do ELISA justificaram a necessidade do desenvolvimento de um teste barato, simples, e que apresente sensibilidade e especificidade maiores que a IDGA e pelo menos semelhantes ao ELISA.

Tendo em vista a importância da caprinocultura na economia, e a ação espoliativa desta enfermidade nos rebanhos caprinos, objetivou-se neste trabalho:

- Realização de levantamento epidemiológico para CAE, com ênfase nos rebanhos que apresentam algum grau de melhoramento e nos nativos/SRD no Estado do Ceará;
- Conhecer o manejo sanitário empregado nos criatórios caprinos do Ceará e, do ponto de vista do criador, os problemas sanitários mais relevantes;
- Padronizar um ELISA indireto utilizando antígenos do vírus total para o diagnóstico da CAE e comparar com a IDGA comercial;
- Padronizar o teste *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico da CAE e comparar a sensibilidade e especificidade de três testes sorológicos (IDGA x ELISA-i x *Dot-Blot*); e
- Testar a purificação das proteínas dos LVPR através da utilização de coluna de afinidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As lentivirose foram identificadas desde o início do século passado quando, em 1904, foi reportada a Anemia Infecciosa Equina (Vallé & Carré). Estas viroses podem ser divididas em dois grupos com base no seu tropismo por diferentes células hospedeiras. O vírus da anemia infecciosa equina e os lentivírus ovino e caprino replicam predominantemente em macrófagos. Em contraste, os lentivírus de humano, símio e felino replicam tanto em macrófagos como em linfócitos. Esse tropismo por diferentes células implica nas diferentes manifestações clínicas destas doenças (Clements & Zink, 1996).

2.1- LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)

Ao estudar o vírus Maedi-Visna, Sigurdsson (1954) designou o termo "vírus lento" ou lentivírus àquelas infecções causadas por retrovírus que desenvolvem infecções crônicas de evolução lenta, persistente, progressiva e degenerativa. A síndrome Artrite-encefalite caprina (CAE) foi inicialmente descrita nos Estados Unidos da América, sob a forma clínica de leucoencefalomielite em cabritos e o vírus foi isolado em 1980, por Crawford e colaboradores em *explants* de membrana sinovial de um caprino adulto com artrite.

2.1.1 – Classificação

Os lentivírus causadores da Artrite-encefalite Caprina (CAEV) e Maedi-Visna (MVV) pertencem à família *Retroviridae*, são complexos não oncogênicos, e são intimamente relacionados fenotípica, biológica e antigenicamente, o que os insere no conceito de quasiespecies virais (Pasick, 1998). Vários outros vírus de importância veterinária e humana também estão incluídos neste gênero, como os vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV), e das imunodeficiências humana (HIV), bovina (BIV), felina (FIV) e símia (SIV). Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples hospedeiro, levando a sérios problemas ou à morte; multiplicam-se também em células em repouso (não ativadas); infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multi-sistêmica (AIEV, MVV e CAEV), associada a síndromes de

imunodeficiência (SIV, HIV e FIV); e apresentam alta taxa de mutação, com conseqüente diversidade genotípica, fenotípica e antigênica (Clements & Payne, 1994; Gonda, 1994; Reischak, 2000).

2.1.2- Estrutura e genoma

Os LVPR têm diâmetro de 80 a 100 nm, são pleomórficos, esferóides (Clements et al., 1980) e tem uma densidade buoyant de 1.14 a 1.18 g/mL (Clements et al., 1980; Dixon et al., 1983).

A partícula viral pode ser dividida em duas partes: a externa e a interna (Figura 1). Na parte externa encontra-se um envelope fosfolipídico constituído pelos produtos do gene *env*, as glicoproteínas de superfície (SU) e transmembrânica (TM), que estão associadas covalentemente e atuam na penetração do vírus na célula. A parte interna é constituída pelos produtos dos genes *gag*, as proteínas do capsídeo (CAP), nucleocapsídeo (NC) e Matriz (MA), e do gene *pol*, as proteínas com funções enzimáticas: protease (PR), transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e dUTPase, e pelo RNA genômico (Gonda, 1994; Joag et al., 1996).

O genoma dos lentivírus é constituído por duas cópias idênticas do RNA, não complementares, unidas por pontes de hidrogênio, de polaridade positiva e aproximadamente 9000 a 10000 pares de bases. É composto por genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*), genes de regulação (*tat*, *rev* e *vif*) e por duas regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5' (RU5) e 3' (RU3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral. O DNA proviral resultante da retrotranscrição apresenta duas regiões terminais não codificadoras (LTR – *long terminal repeat*). Os genes estruturais dispostos da extremidade 5' para 3' do genoma (Figura 2) são *gag*, *pol* e *env*, além de pequenas ORF (*open reading frames*): *tat*, *rev* e *vif* codificadoras para proteínas reguladoras (Clement & Payne, 1994; Gonda, 1994). Alguns isolados de LVPR já foram seqüenciados, tais como: MVV K1514 (Sonigo et al., 1985), CAEV Cork (Saltarelli et al., 1990), SA-OMVV (Quérat et al., 1990) e MVV EV1 (Sargan et al., 1991) e estes apresentam organização similar a outros lentivírus.

As proteínas do gene *gag* são originadas de vários polipeptídios intermediários derivados do

precursor pr55kDa que origina inicialmente o precursor pr47kDa, de curta duração, e dá origem às proteínas: p28, p19 e p16. O papel dos precursores intermediários é desconhecido. As proteínas do gene *env* são originadas de uma glicosilação translacional do precursor pr90kDa que dá origem ao precursor pr150kDa, e por um processo de clivagem, origina as glicoproteínas de superfície (gp135 e/ou gp90) e a transmembrânica (gp45) (Cheever et al., 1988a). As enzimas utilizadas na replicação viral são codificadas pelo gene *pol* sendo que a protease é responsável pelas clivagens dos produtos dos genes *gag* e *pol*, a transcriptase reversa é responsável pela transcrição do RNA genômico em DNA fita dupla e a integrase coordena a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (Tavares & Pereira, 1999). Existe um grande número de proteínas dos LVPR e uma grande variação na sua classificação segundo os autores. A Tabela 1 apresenta as proteínas e glicoproteínas e seus precursores identificados por imunoprecipitação ou *immunoblotting* em trabalhos realizados com LVPR.

Os genes de regulação dos LVPR são encontrados entre os genes *pol* e *env* e codificam as proteínas de regulação da expressão viral: *tat*, *vif* e *rev*. Estas proteínas não se encontram no vírus e somente são traduzidas durante a replicação viral, na qual participam ativamente (Narayan & Clements, 1989).

2.1.3- Replicação

O ciclo de replicação dos lentivírus (Figura 3) inicia-se com o reconhecimento e ligação do vírus ao receptor celular e com fusão e penetração do NC viral no interior da célula hospedeira. Para os LVPR, prováveis receptores têm sido relatados: um complexo membranoso que interage com a SU do CAEV, uma molécula de 50 kDa de células do plexo coróide ovino e polipeptídeos do MHC de classe II segundo Hullinger et al. (1993), Crane et al. (1991) e Dalziel et al. (1991), respectivamente. Após a ligação específica da glicoproteína de superfície com o respectivo receptor, ocorre a fusão do envelope viral com a membrana da célula (Gonda, 1994). Esta fusão é mediada por uma porção hidrofóbica da proteína transmembrânica do envelope que penetra na

membrana da célula possibilitando a fusão (Oliveira, 1994).

Após a fusão inicia-se a retrotranscrição do RNA viral, pela ação da TR, que promove a síntese do DNA proviral e este é capaz de se integrar no genoma celular e ser transcrito pela RNA polimerase II. Na fase da síntese do DNA as seqüências RU3 e RU5, presentes no genoma do vírus, são duplicadas formando as LTR, as quais contém o sítio de iniciação da transcrição para RNA polimerase II. A TR inicia a transcrição com a presença de um RNAt celular, que adiciona nucleotídeos na extremidade 5' e no final transcreve o RNA genômico em DNA de fita dupla (Sonigo et al., 1985).

Depois da síntese do DNA viral este migra para o núcleo, onde é encontrado sob formas circulares contendo uma ou duas LTRs, e sob ação da IN é integrado ao núcleo. Poucas moléculas de DNA são integradas e este fato é importante para a persistência da infecção (Haase, 1986). O genoma viral então torna-se parte do DNA celular e é duplicado durante a divisão celular. Como resultado, uma vez infectado pelos LVPR, os animais permanecem infectados por toda a vida e os LVPR podem ser isolados de animais soropositivos mesmo anos após a infecção original (Concha-Bermejillo, 1997).

O DNA proviral utiliza o sistema celular de transcrição para a síntese de RNA genômico ou RNA's mensageiros (RNAm) subgenômicos, através da ação da enzima celular RNA polimerase II. Uma fase inicial é caracterizada pela presença de RNAm responsáveis pela produção dos genes de regulação (*tat* e *rev*) e numa fase tardia, onde ocorre intensa transcrição com a produção de pequenos e grandes RNAm, das proteínas estruturais (*gag* e *env*), das enzimas virais (*pol*) e da proteína de regulação *vif* (Vigne et al., 1987; Sargan et al., 1994).

O DNA viral integrado pode permanecer latente até que fatores celulares ou virais o ativem. A ação dos fatores celulares dos LVPR pode ocorrer com os fatores *c-jun* e *c-fos*, presentes nos macrófagos ativados, que se ligam às seqüências ativadoras AP (1 e 4) da LTR (Hess et al., 1989; Shih et al., 1992; Gdovin & Clements, 1992; Neuveut et al., 1993) ou, ainda, por outro fator celular induzido pelo interferon γ , secretado em resposta a infecção viral, que

atua nas LTR extremidade 5' ativando a replicação (Tong-Starksen et al., 1996). Com relação aos fatores virais é possível que as proteínas *tat*, *rev* e *vif* possam estar envolvidas. A *tat* promove a transativação que ocorre pelas seqüências AP1 e AP4 das LTR do vírus MVV (Gdovin & Clement, 1992; Carruth et al., 1996). Com relação ao CAEV o gene *tat* não é essencial à replicação (Harmache et al., 1998). A proteína *rev* interage com o RNAm de *env* e é necessária para transpor da etapa inicial para a tardia da expressão lentiviral, facilitando a saída do núcleo para o citosol dos RNAm não transformados de *gag* e *pol* e do RNAm com transformação incompleta de *env* (Schoborg et al., 1994). A função da proteína *vif* não está bem estabelecida, entretanto julga-se não ser necessária no processo de infecção, mas atua na replicação do vírus, através na formação e/ou liberação do CAEV (Harmache et al., 1995).

Acredita-se que a tradução dos RNAm dos lentivírus é realizada por fatores celulares e leva à fabricação de polipeptídeos precursores, que são clivados por enzimas proteolíticas dando origem às proteínas virais. Os RNAm codificantes para *env* são traduzidos nos polirribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso e o produto fica encostado na membrana celular, enquanto que os RNA completos são traduzidos em precursores *gag* (pr55kDa) ou *gag-pol* (pr170kDa), nos polirribossomos livres. Após a síntese dos componentes virais ocorre a montagem, fenômeno controlado pelo precursor *gag*, com encapsulação de duas moléculas de RNA genômico, RNAt *primer* e TR; processamento proteolítico dos polipeptídeos precursores e o brotamento das partículas virais, que adquirem componentes lipídicos da membrana celular para composição do envelope viral (Clements & Payne, 1994; Coffin, 1996). Após o brotamento existe a maturação viral com a ação de vários processos de clivagem dos precursores (Gonda, 1994).

2.1.4- Tropismo

A replicação dos LVPR *in vivo* ocorre principalmente nas células do sistema monocítico-fagocitário, sendo os macrófagos a grande maioria das células infectadas (Luján et al., 1994; Brodie et al., 1995; Concha-Bermejillo, 1997). Segundo Gendelman et al. (1986), a infecção nas células depende da

presença de receptores para o vírus. Verificaram, também, que poucos monócitos tem estes receptores, entretanto estes aumentam após sua maturação. Os linfócitos tem sido também infectados, entretanto sem multiplicação viral (Zink & Johnson, 1994). O RNA viral foi detectado, ainda, em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas, várias células do sistema nervoso (plexo coróide, células microgliais, astrócitos, oligodentrócitos e neurônios) e da glândula mamária (Zink et al., 1990; Brodie et al., 1995; Sanna et al., 1999; Mselli-Lakhal et al., 1999; Lerondelle et al., 1999). Estudos usando isolamento viral, imunocitoquímica e hibridização *in situ* tem mostrado que os LVPR podem penetrar nestas células, entretanto a infecção produtiva é restrita às células da linhagem dos macrófagos (Concha-Bermejillo, 1997) e da glândula mamária (Mselli-Lakhal et al., 1999; Lerondelle et al., 1999). *In vitro* os LVPR infectam e replicam em macrófagos (Narayan et al., 1983), células fibroblásticas de plexo coróide, de membrana sinovial (Narayan et al., 1980; Quérat et al., 1984), células musculares lisas (Leroux et al., 1995) e da glândula mamária (Mselli-Lakhal et al., 1999; Lerondelle et al., 1999). Recentemente, Jan et al. (2000) verificaram, *in vitro*, que as células endoteliais vasculares são susceptíveis a uma infecção produtiva pelo CAEV.

2.1.5- Relação antigênica

Bertoni et al (1994) infectaram cabras com amostra CAEV-Cork, e por imunoprecipitação com radiomarcagem das proteínas virais verificaram uma semana após a infecção (PI), a presença de anticorpos contra a proteína precursora do gene *env* (p150^{env}) e com três semanas PI contra a proteína precursora do gene *gag* (p47^{gag}). Anticorpos contra outras proteínas dos genes *env* e *gag* foram detectadas ao mesmo tempo (três semanas PI).

Em 1980, Narayan e colaboradores verificaram relação antigênica entre a proteína p30 do MVV e um vírus responsável por leucoencefalomielite caprina. A despeito da reação cruzada, verificou-se que o vírus caprino era também antígenicamente distinto, uma vez que não foi neutralizado por uma amostra de soro ovino com altos títulos de anticorpos neutralizantes para o MVV. Os lentivírus CAEV e o MVV manifestaram-se intimamente relacionados

imunologicamente, pois um soro caprino infectado com CAEV precipitou proteínas e glicoproteínas dos dois vírus, apesar do perfil eletroforético dos vírus diferir significativamente, com exceção da proteína do capsídeo que apresentou peso molecular de 28000 daltons para o CAEV e 27000 daltons para o MVV (Dahlberg et al., 1981).

Fundamentado no sequenciamento do genoma e reatividade antigênica cruzada, Roberson et al. (1982), verificaram que a amostra CAEV utilizada mostrava menos de 20% de homologia com o MVV, configurando portanto a distinção entre os dois vírus, apesar de serem antigenicamente relacionados por apresentarem determinantes antigênicos em comum na proteína p28 do capsídeo. Os autores sugerem a existência de uma sequência conservada de nucleotídeos no gene *gag*, que codifica os determinantes da proteína p28.

Gogolewski et al. (1985) relataram que os LVPR são compostos aparentemente por oito componentes protéicos principais sendo quatro glicoproteínas e quatro core proteínas. Todas as oito proteínas dos MVV e CAEV reagiram com soro de cabra positiva, entretanto as glicoproteínas do MVV apresentaram bandas mais fracas com soro ovino (heterólogo). Corroborando com estes achados Knowles et al. (1994) verificaram que a IDGA que utilizou antígeno caprino foi mais sensível na detecção de anticorpos para o CAEV do que aquela onde utilizou-se antígeno de origem ovina, evidenciando diferenças antigênicas entre os produtos dos genes *gag* e *env* dos dois vírus.

Estudos de McGuire (1987) e Marcom et al. (1991) confirmaram que entre o CAEV e o MVV existe no mínimo um epitopo em comum em cada uma das suas proteínas estruturais. A despeito disto é também sabido que ambas viroses tem a capacidade para apresentar variação antigênica significativa e que dentro do mesmo animal infectado pode existir mais de uma cepa viral ao mesmo tempo (Ellis et al., 1987).

As proteínas p28, gp 135 e gp47 são consideradas os principais antígenos imunodominantes na infecção pelos LVPR (Gogolewski et al., 1985; Rosati et al., 1995). Em decorrência desta reação imunológica cruzada, justifica-se o uso de antígenos de lentivírus ovino ou vice versa para detectar

anticorpos para LVPR em ovinos e caprinos (Rosati et al., 1995).

Existem poucos estudos com relação a reações cruzadas dos LVPR com outros lentivírus. Maslak & Schmerr (1993) verificaram reatividade unilateral do MVV e o HIV, pois soros ovinos com anticorpos para MVV reagiram, por *immunoblotting*, com a p24 do HIV, entretanto o contrário não foi observado.

2.1.6- Heterogeneidade genética

A tradicional visão que a Maedi-Visna e a Artrite-Encefalite caprina são causadas por agentes etiológicos distintos pode estar antiquada à luz das novas discussões. Em substituição, os LVPR são melhor vistos dentro do conceito de *quasispecies* virais (Pasick, 1998). O fato de os RNA vírus em geral, e em especial os lentivírus, existirem como quasispecies é atribuído ao fato que a RNA polimerase tem intrinsecamente altas taxas de erro e pela falta de um mecanismo de correção (Steinhauer & Holland, 1987).

Os lentivírus tem alta taxa de mutação, de 0,5 a 1 genoma por ciclo de replicação, que são acumuladas e auxiliam à rápida evolução desse grupo de vírus (Castro, 1998). Coffin (1996) e Preston & Dougherty (1996) relataram que estas mutações decorrem, geralmente, de erros nas polimerizações, durante o ciclo de replicação lentiviral, com substituições de bases, deslocamento de janelas, rearranjo genético, recombinação e hipermutações. A principal responsável por erros é a TR que, ao contrário das polimerases celulares, apresenta baixa fidelidade, devido a ausência da ação da 3' - 5' exonuclease, necessária às correções de erros surgidos durante a polimerização. Contudo, as mutações também podem ser causadas por erros da DNA polimerase celular, durante a replicação do DNA proviral, e da RNA polimerase celular II, quando da síntese de RNA a partir do DNA proviral (Preston & Dougherty, 1996).

Os LVPR apresentam significativa variabilidade antigênica e genômica alterando as propriedades biológicas do virion, assim como a persistência viral no hospedeiro, o tropismo celular, a taxa de replicação, a citopatogenicidade e o desenvolvimento da doença (Leroux et al., 1996).

Estes lentivírus podem ser classificados conforme nas suas propriedades biológicas ou fenotípicas. Os LVPR receberam as designações tipo I ou grupo MVV e tipo II ou grupo CAEV (Quérat et al., 1984; Zink & Johnson, 1994). O vírus tipo I tende a ser altamente citopático *in vitro*, patogênico *in vivo* e induz à produção de anticorpos neutralizantes, enquanto o vírus tipo II tende a produzir infecção persistente não lítica em cultura de células, exibindo baixa patogenicidade em animais infectados e induzindo a produção de anticorpos não neutralizantes. As informações das seqüências genômicas têm promovido alguns indícios sobre as nuances que relacionam o genótipo e o fenótipo (Pasick, 1998).

Devido à alta variabilidade genômica dos lentivírus, a escolha dos *primers* em genes relativamente conservados como *pol*, *gag* e da LTR, combinado a com as condições de reação para a máxima sensibilidade é decisiva para detecção de um grande espectro de cepas de campo de ambos CAEV e MVV (Zanoni, 1998).

Uma estrutura populacional complexa foi verificada por Leroux et al. (1997) analisando seqüências dos genes *env* e *pol* de isolados franceses de LVPR de origem ovina e caprina, assim como o HIV, SIV e FIV. Pela análise filogenética foi proposta a classificação dos LVPR em quatro grupos: I e III (isolados de origem ovina e caprina), II (isolados de origem caprina, incluindo o CAEV Cork) e IV (composto por três isolados ovinos de referência: K 1514, SA-OMW e EV 1). A partir destes resultados, concluíram que os LVPR constituem um grupo grande e heterogêneo e não uma coleção de espécies distintas com hospedeiros e potencial patogênico bem definidos.

Num estudo entre LVPR de diferentes regiões do mundo, Zanoni (1998) encontrou uma relação complexa quando as seqüências foram analisadas filogeneticamente. Seis diferentes grupos foram identificados, sem uma separação evidente entre os isolados caprinos e ovinos de LVPR. A divergência entre os isolados foi de 35%, 22% e 16% nos fragmentos de LTR, *env* e *pol* e *gag*, respectivamente. Observou-se uma indicação clara de transmissão interespecie, de suma importância epidemiológica quando programas de controle são considerados.

No Brasil, Marchesin (1997) estudou cinco isolados brasileiros de CAEV analisando parte do gene *gag*. Os resultados evidenciaram diferenças entre os isolados brasileiros permitindo separá-los em três grupos distintos de acordo com o perfil da digestão enzimática. Castro (1998) amplificou e seqüenciou parte do gene *pol* e o gene *tat* de isolados de CAEV dos estados de Minas Gerais e Pernambuco. A análise filogenética das seqüências destes genes indicou que o isolado de Pernambuco foi estreitamente relacionado ao isolado islandês MVV K1514, enquanto os isolados de Minas Gerais foram mais relacionados ao CAEV. Reischak (2000) estudando três isolados caprinos e um isolado ovino do Rio Grande do Sul verificou que dois destes apresentavam características líticas nos cultivos celulares secundários e de linhagem, indicando diversidade quanto ao ciclo de replicação viral *in vitro* destes isolados.

2.2- VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)

Os primeiros relatos de quadros clínicos compatíveis por lentivírus em caprinos foram citados na Índia com lesões compatíveis ao Maedi-visna (Rajya & Singh, 1964). Sintomatologia nervosa com paralisia, devido a lesões granulomatosas com desmielinização cerebral, e poliartrite foram posteriormente narradas na Alemanha (Stavrou et al., 1969). Em 1974, Cork e colaboradores relataram leucoencefalomielite e pneumonia intersticial em caprinos criados nos Estados Unidos. Posteriormente, O'Sullivan (1978) relata o problema semelhante na Austrália. Através de trabalhos de Narayan et al. (1980), estabeleceu-se uma relação antigênica entre os grupos de vírus Maedi-Visna (MVV) e o vírus da Leucoencefalomielite caprina. O vírus foi isolado, pela primeira vez nos EUA, a partir de cultivo de membrana sinovial de animal com artrite, tendo sido detectadas partículas com características de retrovírus, passando a ser denominado CAEV - amostra 63 (Crawford et al., 1980).

2.2.1 – Epidemiologia

Levantamentos epidemiológicos, utilizando diversas técnicas sorológicas têm sido realizados com o objetivo de determinar a

prevalência ou a ocorrência da infecção pelo CAEV nos caprinos. Pela literatura verifica-se que o vírus apresenta distribuição cosmopolita, sendo detectado em diferentes países de todos os continentes, utilizando os testes IDGA ou o ELISA (Tabela 2). A maior prevalência do CAEV ocorre em países com exploração tecnificada (Rowe & East, 1997), tais como: Canadá, França, Noruega, Estados Unidos, Suíça, Espanha onde se verificou mais de 65% de animais soropositivos nos rebanhos (Adams et al., 1984; Gonzáles et al., 1987).

No Brasil sua presença foi observada inicialmente por Moojen et al. (1986) no Rio Grande do Sul, entretanto Cunha & Nascimento (1995) analisando soros datados da década de 80 verificaram 21% de animais positivos para CAEV. A partir de então, sua presença foi confirmada em diversos estados, conforme apresentado no Tabela 3.

Fatores ligados ao manejo do rebanho têm forte influência na disseminação da doença, sendo a prevalência da CAE maior em países onde os animais são criados de forma intensiva. A utilização de armazenamento do colostro e/ou leite de várias cabras para alimentar os cabritos, tem sido associada ao aumento da prevalência de CAE, ao contrário do que se observa em raças de produção de carne, com baixa incidência em todo o mundo, provavelmente devido ao seu manejo extensivo, com menor contato entre os animais e ao fato dos cabritos só receberem leite de suas mães (Robinson & Ellis, 1985).

A infecção acomete os caprinos independentemente de sexo, raça e idade, apesar de relatos indicarem maior prevalência em raças caprinas leiteiras (Nazara et al., 1985; Grant et al., 1988; Saraiva Neto, 1993; Melo, 1996), e animais machos (Grewal et al., 1986; Pinheiro et al., 1999). Entretanto os estudos são de difícil interpretação em relação aos fatores ligados ao manejo e origem das diferentes raças (Cutlip et al., 1988; Rowe & East, 1997).

A prevalência da infecção aumenta com a idade (Grewal et al., 1986; East et al., 1987). Tem-se observado que a frequência de soropositivos é maior em caprinos mais velhos (Houwers & Van der Molen, 1987; Rowe et al., 1991; Saraiva Neto et al., 1995), porém em rebanhos com alta taxa de infecção, a soroprevalência

pode ser elevada entre animais jovens (East et al., 1987).

Os rebanhos afetados apresentam taxa de infecção invariavelmente superiores aos casos de manifestação clínica da doença. A apresentação clínica da doença sob a forma de artrite é altamente variável, podendo variar de 8% a 38% segundo East et al. (1987). O tempo para o aparecimento dos sintomas clínicos também tem grande variação, podendo ser de meses até anos (Knowles, 1997). A dinâmica da manifestação da doença ainda não é completamente conhecida, mas sabe-se que fatores ambientais podem provocar trauma persistente ou recorrente às articulações, como pisos de concreto ou saltos diários de plataformas elevadas de ordenha, o que predispõe os animais à manifestação clínica da artrite viral (Smith & Sherman, 1994).

Peretz et al. (1993) relatam que após a introdução de animais infectados num criatório, a conversão bem como os casos de manifestação clínica e intensidade das lesões são muito variáveis, dependendo do nível de estresse, da nutrição e do manejo sanitário.

2.2.2 – Transmissão

Os caprinos infectados de forma persistente funcionam como reservatório e fonte de infecção do CAEV. A transmissão ocorre por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário, principalmente macrófagos. A principal via de transmissão é a digestiva, geralmente, no período neonatal, através do leite e/ou colostro de cabras infectadas (Rowe et al., 1992), onde o vírus pode se encontrar tanto livre como em células somáticas.

Rowe et al. (1991) calcularam que 69% das infecções pelo CAEV entre os 2826 animais estudados poderiam ser explicados pela ingestão de leite/colostro contaminado e os 31% restantes seriam atribuídos aos outros tipos de transmissão que resultam em significativo aumento de soroconversão com o passar da idade. Nem toda infecção de cabritos pode ser creditada a ingestão de leite/colostro. Cabritos nascidos de matrizes soropositivas tem até 10% de inexplicável soroconversão até seis meses de idade a despeito dos métodos de pasteurização e termização do colostro (56°C por 60 minutos). A infecção pré-natal dos cabritos pode ocorrer

possivelmente por quatro rotas de transmissão: intrauterina, pelo contato vaginal com a cria, ingestão acidental de colostro de cabras infectadas ou transmissão pela mãe para a cria através da saliva ou secreções respiratórias durante a limpeza da cria (Rowe & East, 1997).

A transmissão do CAEV por contato prolongado entre cabras infectadas e sadias tem sido reportada (East et al., 1987). Em virtude de o CAEV estar predominantemente associado com monócitos e macrófagos, o contato íntimo é essencial para a transmissão horizontal que é muito favorecido pelo longo tempo de exposição e alta densidade de animais infectados (Rowe & East, 1997).

A transmissão via secreção respiratória ou aerossóis não tem sido descrita (Rowe & East, 1997), entretanto Guedes (1999) verificou, experimentalmente, que esta forma de transmissão é viável em caprinos, principalmente em regimes de criação intensivos. Em ovinos existem evidências deste tipo de transmissão do MVV (Houwens & Van der Molen, 1987).

Existe, ainda, o risco de transmissão do CAEV pelo uso de máquinas de ordenha desreguladas, principalmente quando promovem um contra fluxo do leite, injetando leite contaminado no úbere de cabras sadias (East, et al., 1993; Lerondelle et al., 1995). Além disto, mão e toalhas contaminadas também são importantes fatores de contaminação.

Em virtude do estado permanente de viremia dos animais (Al-Ani & Westweber, 1984), agulhas, tatuadores, equipamento de descorna podem ser um grande fator de risco, pois podem conter restos de sangue com células (monócitos e macrófagos) infectadas e possivelmente desencadear a transmissão iatrogênica (Rowe & East, 1997).

Rowe & East, (1997) observaram maior taxa de soroconversão de fêmeas negativas cruzadas com machos positivos que a de fêmeas negativas cruzadas com machos negativos. Este fato aliado à presença do DNA proviral do CAEV, confirmada por PCR no sêmen criopreservado de dois machos (Andrioli et al., 1999) e em 8 de 15 amostras de sêmen fresco (Travassos et al., 1999) em animais naturalmente infectados, demonstra o risco

potencial da transmissão do lentivírus caprino por esta via.

Zink et al. (1990), utilizando a técnica de hibridização *in situ*, detectaram a presença de CAEV nas criptas intestinais e nos túbulos renais de animais soropositivos, indicando que o vírus poderia estar presente nas fezes e urina destes animais.

Além das vias de infecção deve-se levar em conta os fatores que afetam o risco de transmissão como estresse, imunossupressão, dose do vírus e rota de infecção, cepa do vírus, dentre outros.

2.2.3 – Patogenia e resposta imune

O leite e o colostro de fêmeas infectadas, por serem ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, são os principais veículos de transmissão do vírus, sendo o trato intestinal de cabritos a principal porta de entrada para o CAEV. Esta entrada ocorre pela absorção direta de macrófagos infectados através das vilosidades intestinais ou pela infecção das células intestinais pelo vírus, liberados dos macrófagos previamente digeridos por enzimas proteolíticas (Huso et al., 1988). Após penetrar no organismo pela mucosa gastrointestinal, onde ocorre sua primeira replicação, o vírus se dissemina pela corrente sanguínea ou por outras vias, como o líquido céfalo-raquidiano (Perk, 1988). A viremia observada na infecção é associada à célula e à disseminação viral realizada célula a célula e é a principal fonte de transferência dentro do hospedeiro (Blacklaws et al., 1994). O vírus apresenta tropismo principalmente pelas células do sistema monocítico-fagocitário que funcionam como meio de distribuição e replicação viral. A replicação viral geralmente é limitada por determinados fatores, entre os quais cita-se a restrição da replicação viral mediada por interferon, produzido por linfócitos ativados durante sua interação com os macrófagos infectados. O interferon inibe a maturação de monócitos, com conseqüente lentidão da maturação viral (Zink et al., 1987). Na infecção persistente do hospedeiro existe, ainda, uma restrição gênica nos monócitos (Brodie et al., 1995), processamento incompleto da glicoproteína de superfície com interrupção do ciclo viral (Chebloune et al., 1996), além da produção limitada de anticorpos neutralizantes (Smith & Sherman, 1994) o que reduz a

replicação e auxilia a persistência do estímulo antigênico (Bertoni et al., 1994; Cheevers et al., 1993).

Nos tecidos-alvo, tais como sinóvias, interstício pulmonar, plexo coróide e úbere, a ativação da replicação viral, juntamente com a maturação dos macrófagos, induzem à formação das lesões linfoproliferativas que caracterizam a CAE. Segundo Zink et al. (1990), outras células podem também servir como áreas de replicação viral, como as células da membrana sinovial, oligodentrócitos (Perk, 1990), as células epiteliais intestinais, células tubulares renais, e células glandulares da paratireóide, adrenais e da tireóide. Contudo, é o tropismo do vírus por células do sistema imune, particularmente monócitos e macrófagos, o principal fator responsável pela habilidade dos lentivírus em causar infecções crônicas, que persistem por toda a vida do animal.

Concha-Bermejillo (1997) relata que a base do desenvolvimento das lesões dos LVPR parece ser a infecção dos macrófagos. Em resposta ao vírus, a formação de imunocomplexos e a replicação lítica nos macrófagos podem ser responsabilizadas pelas lesões desencadeadas. Outra resposta à infecção persistente dos macrófagos seria a apresentação do antígeno aos linfócitos T, promovendo a cascata de respostas celulares que leva à proliferação de células inflamatórias mononucleares, característica da CAE. Ainda, é sugerido, principalmente no caso de artrite, que a infecção dos macrófagos poderia torná-los menos ativos na fagocitose de debris celulares presentes na articulação, resultando no seu acúmulo e na persistência e evolução crônica da artrite (Klevjer Anderson & Anderson, 1982).

As respostas imunológicas celular e humoral ao CAEV possuem intensidades variadas, que não protegem contra a multiplicação viral (Bertoni et al., 1994). A primeira resposta humoral no MVV, é detectada em torno da terceira semana e está principalmente dirigida contra a proteína do capsídeo; por volta da quinta semana são produzidos anticorpos contra as demais proteínas (do nucleocapsídeo, matriz, transmembrânica e de superfície) (Concha-Bermejillo et al., 1995). Os anticorpos neutralizantes são produzidos em quantidades limitadas, tardiamente e são de baixa afinidade, de modo que não impedem o ciclo de replicação

viral (Kennedy-Stoskopf & Narayan, 1986; Cheevers et al., 1993; Bertoni et al., 1994). Verifica-se, ainda, na infecção pelos LVPR, aumento dos linfócitos T CD4+ (Reyburn et al., 1992) e T CD8+ (Lichtensteiger et al., 1993; Blacklaws et al., 1994) que são responsáveis pela destruição de células infectadas, porém não destroem as que não expressam o provírus.

Os macrófagos e outras células persistentemente infectadas podem produzir e liberar citocinas e proteínas virais com efeito citotóxico sobre as células vizinhas provocando lesões nos órgãos-alvo (Mdurvwa et al., 1994; Concha-Bermejillo, 1997). Experimentos com hibridização *in situ* mostraram que os padrões da expressão de citocinas na CAE foram similares aos achados na artrite reumatóide humana, com poucas células expressando as citocinas derivadas dos leucócitos – interferon γ (IFN γ) e interleucina 2 - e mais células expressando proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)-alfa. Nenhum IFN γ ou células expressando vírus foram achadas nas articulações inflamadas (processo agudo), mas ambos foram detectados em cabras com severa artrite. A resposta humoral e a mediada por células parece ocorrer simultaneamente em áreas distintas da membrana sinovial (Lechner et al., 1997). Adeyemo et al. (1997) verificaram uma desregulação das citocinas produzidas pelos macrófagos com redução TNF-alfa e IL-6 nas cabras cronicamente infectadas, enquanto Lechner et al. (1997) observaram aumento de IL-8 e MCP-1 e diminuição de TNF-alfa, IL1 beta, IL-6, IL-12 e do fator de crescimento de transformação β . Baseados nestes dados verifica-se na CAE um aumento da quimiotaxia, principalmente das células do sistema monocítico-fagocitário e redução do processo agudo da enfermidade. Estudos recentes (Cheevers et al., 2000) relatam uma dicotomia com relação à resposta imune as glicoproteínas de superfície e transmembrânica. No caso das cabras com artrite existe um aumento da IgG1 e da Interleucina 4 e redução dos linfócitos T CD4+, enquanto que os animais sem artrite apresentam baixos níveis de IgG1 e altos níveis de IgG2, aumento dos linfócitos Th1 e aumento da produção de IFN γ . Verificou-se também que a IL12 não é o foco inicial da reação dos linfócitos reativos ao antígeno.

Os anticorpos passivos adquiridos pela ingestão

do colostro persistem em níveis detectáveis no soro de cabritos e cordeiros até aproximadamente seis meses (MacKenzie et al., 1987; Cutlip et al., 1988). Entretanto, Ellis et al. (1983) relatam que estes anticorpos podem permanecer detectáveis até oito meses após o nascimento.

Sem a proteção decorrente da resposta imune, a CAE é uma doença imunopatológica na qual as lesões resultam de resposta imune aos antígenos virais, especialmente no que se refere a glicoproteínas de superfície. Caprinos persistentemente infectados desenvolvem um quadro de artrite aguda quando experimentalmente desafiados, e a severidade das lesões articulares está relacionada com a presença do vírus e de anticorpos antivírus na articulação. As lesões que ocorrem na CAE são principalmente causadas por linfócitos e macrófagos (McGuire et al., 1986). Quando a resposta imune se desenvolve, os anticorpos permanecem por toda a vida do animal, apesar de sua concentração plasmática poder variar em diferentes períodos (Perk, 1990).

A disseminação do vírus provavelmente ocorra pela via hematogênica. Esta afirmação é baseada em vários fatores como a presença do vírus em leucócitos circulantes (Ellis, 1990), a replicação viral em macrófagos (Perk, 1990), o padrão intersticial da pneumonia (Ellis et al., 1988) e a disseminação das lesões no sistema nervoso, a partir das leptomeninges (Norman & Smith, 1983).

A infecção local pode ser fonte de antígenos virais na superfície das células levando a processos citotóxicos diretos ou à inflamação e danos teciduais cumulativos que podem resultar em ativação periódica de células infectadas e na manifestação de populações virais antigênicamente distintas ou de outros epitopos da glicoproteína (gp135) viral (Cheevers et al., 1988b). Um suprimento contínuo de material antigênico, beneficiando a formação de imunocomplexos poderia explicar a interação da resposta imune do hospedeiro e os antígenos virais, aventada por Cheevers et al. (1988b), como causa das lesões inflamatórias, principalmente se for considerado que cabras vacinadas ou persistentemente infectadas e inoculadas com o vírus apresentam lesões mais severas e de curso mais rápido, bem como exacerbação de lesões já existentes (McGuire et

al., 1986). Recentemente, Jan et al (2000) verificaram, *in vitro*, que as células endoteliais vasculares infectadas apresentam capacidade de ligação aos leucócitos duas vezes maior que as células não infectadas e que estas células mantiveram a expressão de marcadores, aumentaram inicialmente a expressão de antígeno MHC-I e posteriormente MHC-II. Tais eventos podem contribuir para a distribuição nos tecidos de células linfóides e para a resposta imune local na infecção dos LVPR.

2.2.4 - Manifestações clínicas e características anátomo-histopatológicas

A infecção pelo CAEV é multi-sistêmica sendo que clinicamente apresenta-se de quatro formas principais: nervosa, artrítica, respiratória e mamária. É geralmente persistente e assintomática, de evolução geralmente crônica. O CAEV compromete o estado geral dos animais infectados com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte (Dawson, 1987; Perrin, 1991; Peretz et al., 1993). Dentre estas formas, a mais comumente observada é a artrítica, acometendo animais adultos (Crawford & Adams, 1981). O aparecimento de uma ou de outra das formas clínicas pode depender das condições do manejo praticado na propriedade. Certos fatores, como por exemplo, a constituição do piso, os procedimentos da ordenha e a ventilação das instalações, podem favorecer o aparecimento de uma das formas, seja artrítica, mamária ou respiratória, respectivamente. Existem, também, diferenças entre a patogenicidade das amostras de CAEV (Cheevers et al., 1988b; Summers et al., 1995), provavelmente decorrente de variantes antigênicas entre amostras do vírus (Narayan et al., 1984), o que parece influenciar na incidência e na severidade das lesões articulares (Cheevers & McGuire, 1988), e, possivelmente, na sua forma de apresentação. As alterações histopatológicas são caracterizadas pelo desenvolvimento de lesão inflamatória com infiltração de células mononucleares em um ou mais órgãos ou tecidos do cérebro, medula, articulações, pulmões (Adams & Crawford, 1980b; Crawford & Adams, 1981; Pawlisch & Maes, 1984), úbere (Al-Ani & Vestweber, 1984; Dawson & Wilesmith, 1985), rins (Brugere-Picoux, 1984) e útero (Ali, 1987).

A forma artrítica é a mais comum sendo observada em caprinos com mais de oito meses de idade (González et al., 1987). As articulações carpianas são as mais afetadas e apresentam-se alteradas uni ou bi-lateralmente. Outras articulações podem, também, ser atingidas, como a atlanto-occipital, do jarrete e da tuberosidade isquiática, além das bursas atlântica e supra-espinhal (Crawford & Adams, 1981; González et al., 1987). As manifestações observadas nesta forma resultam da distensão da cápsula articular e proliferação do tecido peri-articular, com conseqüente aumento do diâmetro das articulações envolvidas. Observa-se tenosinovite hiperplásica, fibrose do tecido conectivo, em associação com necrose e mineralização do tecido peri-articular e acúmulo de exsudato resultante de lesões vasculares (Woodard et al., 1982; Pereira, 1995). Os animais afetados apresentam claudicação em graus variados, e, em casos graves, imobilidade e decúbito podem ser observados (Crawford & Adams, 1981; González et al., 1987). Ao exame macroscópico, o líquido sinovial apresenta-se com coloração avermelhada ou amarronzada, e viscosidade diminuída, e ao microscópio, revela aumento do número de leucócitos, principalmente de mononucleares (Crawford & Adams, 1981; Woodard et al., 1982; Pinheiro et al., 2000a).

A forma nervosa ocorre com maior frequência em cabritos de um a quatro meses de idade (Cork et al., 1974), e, só raramente, tem sido registrada em animais adultos (Crawford & Adams, 1981; Norman, & Smith, 1983). Os achados mais frequentes são paresia dos membros posteriores e ataxia. Os cabritos têm apetite e atividade cerebral normal. Ocasionalmente, evidencia-se hipertemia. A paresia, que inicialmente é unilateral, entre o quinto e o décimo dia torna-se bilateral e evolui para tetraparesia (Cork et al., 1974; Norman & Smith, 1983). Depressão, torcicolo e andar em círculo são sintomas indicativos de lesão cerebral. Também são evidentes sintomas de lesões da massa branca medular, como hipertonia, hiperreflexia, e para ou tetraparesias (Norman & Smith, 1983). As lesões dos tecidos nervosos são evidenciadas apenas ao exame microscópico, e caracterizam-se por meningoencefalomielite, com manguitos perivasculares onde predominam células mononucleares (linfócitos, macrófagos e células

mononucleares) e desmielinização. As lesões são restritas à massa branca, sem comprometimento dos neurônios, exceto quando há destruição de grandes áreas de massa branca. As meninges e medula podem ser atingidas, apresentando infiltração mononuclear (Cork et al., 1974; Cork, 1976; Norman & Smith, 1983; González et al., 1987).

A forma pulmonar, frequentemente, está associada à nervosa (Cork et al., 1974; Norman & Smith, 1983). Sua apresentação parece rara e de pouca gravidade. Os sinais clínicos são tosse, dispnéia, secreção nasal após exercícios físicos, taquipnéia, macicez pulmonar, estertores úmidos e diminuição do murmúrio vesicular à auscultação (Knight & Jokinen, 1982; Serakides et al., 1996). As lesões variam desde congestão e pneumonia intersticial acompanhada de pronunciada hiperplasia linfóide (Cork et al., 1974). Microscopicamente a pneumonia intersticial é caracterizada por infiltração de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, hiperemia do septo interalveolar e hiperplasia dos tecidos linfóides pulmonares (Norman & Smith, 1983; Ali, 1987). Serakides et al. (1996) classificaram os animais em três grupos de acordo com as alterações microscópicas encontradas: pneumonia intersticial, pneumonia broncointersticial aguda e pneumonia broncointersticial crônica com fibrose pulmonar.

A manifestação na glândula mamária é freqüente e tem grande significado econômico em caprinos, pois compromete a produção leiteira e predispõe a glândula mamária a infecções secundárias (Smith et al., 1988; Lerondelle, 1988). Cabras infectadas natural e experimentalmente apresentam mamite aguda ou crônica caracterizadas pelo úbere endurecido e, geralmente, assimétrico com presença de nódulos e aumento da sensibilidade dolorosa, além do aumento dos linfonodos retromamários (Pereira, 1995). Histologicamente são evidenciadas infiltrações perivasculares e do parênquima da glândula mamária por células mononucleares, linfoproliferação e formação de folículos linfóides (González et al., 1987; Cheevers & McGuire, 1988; Perk, 1988). Nord & Adnoy (1997) estudando a influência da CAE na produção láctea não verificaram alteração significativa na produção, mas apenas um aumento de células somáticas nos animais infectados.

2.2.5 - Controle e prevenção

A importação de animais, apenas de áreas indenes, com a exigência de testes sorológicos negativos (ensaios imunoenzimáticos) e/ou reação em cadeia de polimerase, é a melhor forma de prevenir a introdução do agente, em um país ou criatório livre da doença. Os animais devem ser testados antes e durante a quarentena, só se introduzindo no rebanho, animais que tiverem resultados negativos em dois testes, intercalados de seis meses, período no qual os animais devem permanecer isolados. Convém lembrar, que o CAEV já foi isolado do leite de animal soronegativo (Adams et al., 1983), o que reforça a importância dos animais procederem de criatórios ou países indenes.

Nos plantéis suspeitos, ou nos positivos, algumas recomendações devem ser adotadas, no sentido de reduzir o risco da propagação dos LVPR. Separar os recém-nascidos imediatamente após o parto, sem contato com as secreções neonatais; isolar os cabritos dos animais adultos, em local bem ventilado, a pelo menos dois metros de distância (Rowe et al., 1992); administrar colostro de cabras não infectadas ou termizado a 56°C durante uma hora; alimentar os cabritos com leite de cabra negativa pasteurizado ou fervido ou leite de vaca; testar sorologicamente os cabritos a intervalos de seis meses, separando os reagentes positivos. Esta estratégia tem sido adotada com resultados satisfatórios (Adams et al., 1983; MacKenzie et al., 1987; EMBRAPA, 1994), porém, em condições de campo, deve-se considerar que não é fácil a sua execução. Primeiro há necessidade de acompanhamento do parto e imediata separação do cabrito; segundo, nem sempre os tratadores são rigorosos quanto à observância do tratamento térmico do leite e/ou colostro. Para minimizar estes condicionantes, e facilitar a adoção das medidas, poder-se-á programar a reprodução, com sincronização dosaios das cabras positivas e posterior indução artificial do parto, com conseqüente concentração dos nascimentos. O colostro produzido nesta estação poderia ser tratado a 56°C e estocado, sob congelamento, servindo, desta forma, como banco de colostro para cabritos nascidos fora da época programada (Embrapa, 1994; Gouveia et al., 1994).

Não se pode deixar de considerar a possibilidade de transmissão horizontal, que é mais rápida e mais freqüente entre cabras em lactação que entre as secas e as fora da idade reprodutiva. Por este motivo deve-se rigorosamente, separar os adultos soropositivos dos negativos, e manejar os cabritos separados dos adultos, mesmos daqueles soronegativos, já que o vírus pode ser eliminado por cabras soronegativas (Adams et al., 1983).

Em decorrência da presença do DNA proviral no sêmen (Andrioli et al., 1999) deve-se excluir, do manejo reprodutivo, tanto o reprodutor infectado como também o seu sêmen. Até o presente momento não existe registro na literatura que os LVPR possam ser transmitidos pela transferência de embrião, entretanto esta técnica deve ser realizada conforme recomenda a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow & Seidel, 1999).

Na impossibilidade de seguir este programa, recomenda-se, pelo menos, que os cabritos tenham acesso apenas ao colostro e ao leite de suas respectivas mães. Desta forma, pode-se diminuir a velocidade de disseminação do agente no plantel, até que seja possível a adoção de medidas mais rigorosas.

O monitoramento laboratorial das medidas sanitárias e de manejo implantadas é fundamental para o sucesso dos programas de controle, sendo que a periodicidade dos exames e o tipo de técnica de diagnóstico são variáveis segundo as modalidades epidemiológicas determinadas com base na prevalência sorológica inicial e, ainda, segundo o estágio do programa de controle em andamento (Embrapa, 1996a).

2.3- DIAGNÓSTICO DOS LENTIVÍRUS DOS PEQUENOS RUMINANTES

O diagnóstico dos LVPR fundamenta-se no quadro clínico (quando presente), consolidado por provas laboratoriais para detecção direta ou indireta da infecção. O isolamento viral, a microscopia eletrônica, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização *in situ* são os principais métodos utilizados para a detecção direta do CAEV. Em decorrência das características da própria enfermidade, principalmente a infecção persistente dos LVPR, a sorologia é uma forma funcional de

diagnóstico evidenciando indiretamente a infecção, podendo ser realizada através de técnicas como imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, ELISA e *immunoblotting*.

2.3.1- Isolamento viral

Apesar do diagnóstico determinante do vírus da infecção ativa pelo CAEV ser alcançado quando do isolamento deste agente em cultivo celular, esta técnica é demorada, dispendiosa, e requer a implantação e manutenção de cultivos celulares especiais (Knowles, 1997). Geralmente os LVPR podem ser isolados de animais vivos pelo cocultivo de células como leucócitos do sangue periférico, células somáticas do leite, com células de plexo coróide ovino para o MVV e células de membrana sinovial caprina para o CAEV. De animais mortos infectados o vírus pode ser isolado a partir de *explants* de tecidos como membrana sinovial (MSC), glândula mamária, pulmão, plexo coróide e tecidos linfóides. Segundo Dawson (1983), a constatação de antígenos virais pode se fazer através de técnicas de imunomarcagem nas células multinucleadas.

O primeiro relato de efeito citopático (ECP) dos LVPR, caracterizado pela formação de células gigantes multinucleadas, foi descrito por Sigurdardóttir & Thormar (1964) num rebanho afetado por Maedi a partir de pulmões de ovinos. Um vírus parecido a Visna, produzindo ECP, foi isolado por Weinhold (1974) a partir de cultivo celular de plexo coróide de um caprino com manifestações clínicas semelhantes àquelas observadas em ovinos acometidos por Visna. Segundo Oliver et al. (1981), verificou-se grande variação quanto ao tipo e o tempo de aparecimento do ECP produzido pelos isolados. Diferentes isolados virais não causam efeitos citopáticos evidentes (Lairmore et al. 1987). Belov et al. (1988) verificaram em cultivos celulares, através de imunofluorescência, que após a formação de sincícios pelo CAEV existe uma redução e até a parada da replicação viral em decorrência da grande destruição celular.

O Lentivírus ovino foi isolado de células mononucleares do sangue de ovinos natural e experimentalmente infectados (Concha-Bermejillo et al., 1996). Estes autores também isolaram o vírus no sêmen de dois ovinos após a inoculação de *Brucella ovis*. Tanto o MVV como o CAEV replicam produtivamente em

macrófagos e cultivos celulares de MSC, no entanto, um padrão restritivo de replicação do CAEV foi observado por Chebloune et al. (1996) em cultivo celular de plexo coróide ovino.

No Brasil, Hötzel et al., (1993) verificaram ECP característico de lentivírus em cultivo celular de MSC, obtido a partir de um caprino sorologicamente positivo para o CAEV. Sincícios foram encontrados 14 dias após a inoculação dos cultivos primários. Milczewski et al. (1997) isolaram o MVV pela primeira vez no Estado do Paraná a partir das articulações e glândula mamária de um ovino com artrite, perda de peso progressiva, tosse, corrimento nasal e mamite e sorologia positiva para LVPR.

2.3.2- Microscopia eletrônica (ME)

O vírus da CAE foi inicialmente observado por ME por Weinhold (1974) em cultivo celular de plexo coróide caprino. As partículas virais de 70 a 110 nm, com um corpo central de 30 a 50 nm, apresentavam forma e tamanho semelhantes aos do MVV. Em 1976, Cutlip & Laird estudando células embrionárias de pulmão ovino infectadas com o MVV observaram, por ME, vários brotamentos virais com 120 a 140 nm de diâmetro além de virions livres no espaço extracelular, medindo de 80 a 110 nm de diâmetro, e, virions e fragmentos virais no citoplasma de células infectadas. Crawford et al. (1980) observaram em tecido de caprino adulto com artrite crônica, partículas virais no citoplasma celular e brotamentos no espaço intracelular e ocasionalmente, partículas no núcleo de células infectadas.

Narayan et al. (1980) estudando o vírus da CAE verificaram que as partículas virais extracelulares eram esféricas e com tamanho variando de 70 a 100 nm, além de constatar intenso brotamento na superfície celular, semelhante ao encontrado com o MVV. Dahlberg et al. (1981) em cultivos celulares de origem caprina e ovina observaram que as células de MSC infectadas com o CAEV apresentavam vários brotamentos virais na sua superfície e dentro de pequenos vacúolos citoplasmáticos, sendo estes brotamentos similares àquelas de retrovírus do tipo C.

Russo (1983), na França, e Moojen (1996), no Brasil, observaram partículas virais maduras na superfície e brotamentos intracitoplasmáticos

em cortes ultrafinos de cultivo celular de MSC infectada com amostras de CAEV de origem francesa e de diferentes isolados brasileiros.

2.3.3- Hibridização *in situ* (HIS)

Segmentos específicos de ácido nucléico de origem viral encontrados em tecidos ou células infectados são capazes de serem detectados por sondas marcadas por enzimas ou radioativamente através da HIS (Brown, 1998). Zink et al. (1990), detectaram através da HIS, quais as células e tecidos de caprinos naturalmente infectados pelo CAEV apresentam replicação viral, e observaram células com transcritos virais nos pulmões, cérebro, glândula mamária, articulações e medula espinhal. Apesar de células positivas (macrófagos e células epiteliais) para RNA viral terem sido encontradas em quase todos os tecidos examinados, os órgãos-alvo inflamados continham maior número de células positivas, sugerindo uma associação entre expressão de genes virais e inflamação. Storset et al. (1996) utilizando sondas de RNA marcadas com fluoresceína para detecção de RNA em cultivo celular de macrófagos caprinos infectados pelo CAEV verificaram que as sondas baseadas nos genes das proteínas da matriz e transmembrânica não foram capazes de detectar o RNA nas células infectadas ao passo que uma sonda da sequência de LTR foi capaz de detectá-lo. O RNA de CAEV foi detectado em alguns macrófagos 24 horas PI enquanto que a maioria das células foi positiva às 96 horas PI. Clavijo & Thorsen (1995a) utilizando uma técnica denominada *slot-blot* hibridização (sonda de DNA detectada por quimiluminescência) verificaram que esta técnica não foi sensível suficiente para detectar o CAEV em células mononucleares periféricas, entretanto quando estas células foram co-cultivadas em MSC as amostras tornaram-se positivas.

2.3.4- Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Vários trabalhos tem demonstrado com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR. A PCR permite por amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (Zanoni et al., 1990; Reddy et al., 1993; Rimstad et al., 1993; Wagter et al., 1998).

Zanoni et al. (1990) demonstrando a alta sensibilidade e especificidade da técnica de PCR detectaram o DNA proviral do CAEV um dia após a infecção dos cultivos celulares, e de apenas uma célula infectada em um cultivo de 10^6 células. Reddy et al. (1993) detectaram o DNA proviral do CAEV através da PCR em células mononucleares do sangue periférico, células de líquido sinovial e células do leite. Verificaram, também, que três animais negativos por IDGA foram positivos por PCR, enquanto dois animais positivos por IDGA apresentaram resultado negativo por PCR.

Rimstad et al. (1993) analisando caprinos pertencentes a um programa de erradicação do CAEV verificaram que 25% foram positivos por PCR e soronegativos por ELISA, IDGA e *immunoblotting*. Constatou-se, ainda que 7% dos animais soropositivos deram resultado negativo quando amostras de sangue foram amplificadas, mas positivo quando o PCR foi realizado a partir de amostras de leite.

Preocupados com a utilização de soro de leite caprino na alimentação de animais adultos, Russo et al. (1997) pesquisaram a presença do CAEV nas células encontradas no soro lácteo para definir seu potencial na transferência horizontal do vírus. DNA proviral foi detectado em células mononucleares e granulócitos presentes no soro de leite, inferindo que o soro lácteo pode ser infectante, difundindo, conseqüentemente, o vírus.

A escolha dos *primers* é de suma importância para o sucesso da técnica de PCR. Rutkoski et al. (1998) pesquisando a presença de DNA proviral do CAEV em 72 amostras de sangue de caprinos, previamente testados pela IDGA, encontraram resultados discordantes entre PCR e IDGA mostrando que os "*primers*" usados foram incapazes de amplificar o DNA proviral em decorrência de diferenças nucleotídicas entre os isolados ou, também, que a quantidade de células contendo o provírus era pequena, não sendo detectado pela PCR.

Wagter et al. (1998) através de PCR, utilizando um *mix* de seis *primers* de três cepas de lentivírus ovino e um de caprino da região conservada do gene *gag*, encontraram resultados discordantes com quantidades diferentes de amostras de sangue (monócitos) demonstrando que a sensibilidade do teste é limitada ao tamanho da amostra. Verificaram que quando

amostraram 1mL de sangue de seis animais nenhum reagiu positivamente, entretanto quando aumentaram a alíquota para cinco mL cinco dos seis animais foram positivos e quando utilizaram 10 mL de sangue todos os animais foram positivos. De 60 animais soropositivos pela IDGA o PCR do sangue detectou somente 53. Observaram, também, que a resposta sorológica pode ser bem lenta até 18 meses após a detecção pelo PCR ou até mesmo não soroconverter e que o PCR é mais eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença.

A detecção de infecção por LVPR através de PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da sequência alvo e da especificidade do *primer*. Entretanto esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando estiver disponível rotineiramente, para identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que esta técnica seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (Knowles, 1997).

2.3.5- Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA)

Devido à praticidade na coleta das amostras e ao custo/benefício, a detecção de anticorpos contra LVPR é amplamente utilizada, e dentre diversos métodos sorológicos, a IDGA é o mais largamente utilizado para o diagnóstico das LVPR (Adams & Gorham, 1986; Knowles et al., 1994; Abreu, 1996), sendo o teste recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico de infecção por LVPR, no caso de comércio internacional de pequenos ruminantes (OIE, 1996). O teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony fundamenta-se na difusão de anticorpo e antígeno em uma base semi-sólida contendo ágar e eletrólitos. Quando antígeno e anticorpo se encontram em concentrações equivalentes, interatuam e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como bandas de precipitação (Roitt et al., 1998).

Em 1977, Cutlip et al. trabalhando com o MVV desenvolveram um teste de IDGA para detectar anticorpos precipitantes. A escolha desta técnica foi deferida por ser simples e em virtude do aparecimento de anticorpos

precipitantes ser anterior ao de anticorpos neutralizantes. Quarenta e oito horas após o teste verificou-se o aparecimento de uma ou duas linhas de precipitação com identidade. Dois testes de microimunodifusão (MIDGA) foram elaborados por Winward et al. (1979) para o diagnóstico do MVV, um hexagonal e outro pentagonal, e comparados com a macroimunodifusão. Nos resultados constatou-se que a microimunodifusão hexagonal apresentava melhores resultados pois a amostra de soro a ser testada ficava posicionada entre dois padrões positivos, facilitando a leitura do resultado além de utilizar menor quantidade de antígeno. Gouveia et al. (2000) encontraram resultados semelhantes utilizando MIDGA para o diagnóstico do CAEV.

Em estudo realizado para o diagnóstico do MVV por IDGA, Klein et al. (1985) verificaram diferenças biológicas significativas entre amostras de laboratório e isolados de campo, o que certamente influencia a resposta imune e o resultado dos testes.

A sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA, imunofluorescência direta e IDGA foram comparados e verificou-se concordância de 97% entre IDGA e ELISA, evidenciando correlação estreita entre estes dois testes (Dawson et al., 1982).

Foram identificadas as proteína gp 135 e p28 como as responsáveis pelas linhas de precipitação observadas na IDGA (Adams et al., 1985). Avaliando dois antígenos de CAEV, gp 135 e p28, para detecção de anticorpos para este agente através de um teste de IDGA, Adams & Gorham (1986) concluíram que o antígeno gp 135 detecta maior número de caprinos infectados do que o antígeno p28, ainda que alguns animais desenvolvam resposta anti-p28 na ausência de resposta anti-gp 135. Os autores salientaram a importância da escolha dos soros de referência utilizados em testes IDGA para diagnóstico de infecção por LVPR. Ao confrontarem a sensibilidade de antígenos precipitantes (p98 e p26) no teste de IDGA para o diagnóstico precoce de infecção pelos lentivirus CAEV e MVV, Remond & Boutrouille (1990) verificaram que o antígeno contendo a p98, a qual pode se tratar de uma forma degradada da glicoproteína externa, de uma proteína externa sem glicosilação ou, ainda, de um precursor da glicoproteína do

MW, detectaram maior quantidade de ovinos positivos do que o antígeno contendo a p26. Entretanto, o antígeno contendo a p26 do MVV ou do CAEV revelou-se mais sensível quando testou-se soros caprinos. Os autores concluíram que, em decorrência de um certo número de animais serem positivos para uma proteína e negativos para a outra e vice-versa, a utilização das duas proteínas no antígeno é de suma importância para alcançar melhores resultados nos programas de controle e/ou erradicação destas doenças.

Utilizando o teste de imunoprecipitação para verificar a sensibilidade e especificidade do teste IDGA empregando como antígenos o CAEV e o MVV no diagnóstico da CAE, Knowles et al. (1994) verificaram 100% de especificidade entre os antígenos, e sensibilidade 35% maior com antígeno produzido a partir do CAEV do que aquela obtida no teste que empregava o antígeno heterólogo (MVV).

Hanson et al. (1996) utilizaram IDGA para detectar anticorpos em caprinos naturalmente infectados pelo CAEV para os antígenos gp135 e p28 do lentivírus MVV. Observaram que os caprinos testados expressavam anticorpos tanto para gp 135 como para p28. Entretanto, ocorreu maior frequência de anticorpos para gp 135 em animais velhos que reagem a apenas uma das proteínas virais. Além disto, a expressão de anticorpos para o CAEV variou ao longo do tempo evidenciando que reações soropositivas e soronegativas podem ocorrer intermitentemente.

Estes resultados demonstram que o sucesso de programas de controle e/ou erradicação para o CAEV, estão sujeitos, em parte, à precisão do teste empregado para a detecção de anticorpos sendo necessária sempre a utilização das duas principais proteínas (p28 e gp 135).

2.3.6- Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

As reações de imunofluorescência indireta possibilitam a visualização da interação antígeno/anticorpo, através de uma anti-imunoglobulina com fluorocromos. Estas substâncias são capazes de absorverem energia luminosa tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo, para retornarem ao seu estado normal e tais substâncias passam a liberar tal energia na forma de fluorescência. Os

fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina (fluorescência vermelha) e o isotiocianato de fluoresceína (fluorescência verde) (Schade, 1995).

São poucos os trabalhos empregando RIFI no diagnóstico dos LVPR. Dawson et al. (1982) comparando os testes RIFI, IDGA e ELISA na pesquisa de anticorpos contra o MVV verificaram que o a RIFI e a IDGA apresentaram concordância de 94%. Rousselot (1989), citado por Reischak (2000), trabalhando com uma cepa do MVV (K1514) e anticorpos monoclonais, utilizaram a RIFI para pesquisar antígenos virais em células infectadas e observaram que o uso de anticorpos monoclonais, oposto dos soros hiperimunes, evita reação inespecífica e eventual leitura duvidosa de resultados.

No Brasil, Reischak (2000) desenvolveu uma RIFI utilizando três vírus isolados brasileiros de caprinos e um de ovino obtidos com cultivos celulares secundários e de linhagem de membrana sinovial ovina, e comparou com o teste de IDGA usando antígeno do MVV. Em amostras de soro caprino e ovino, verificou que a RIFI detectou mais animais soropositivos que a IDGA, sendo que foram observados resultados diferentes de acordo com as cepas virais isoladas e os tipos celulares empregados. A RIFI desenvolvida com os diferentes isolados brasileiros de origem caprina teve sensibilidade e especificidade $\leq 96,8\%$ e $\leq 29\%$, respectivamente, enquanto que o teste empregando o isolado de origem ovina teve sensibilidade $\leq 76,3\%$ e especificidade de 87,4%, quando comparados com a IDGA. A autora relata que a baixa especificidade está relacionada à baixa sensibilidade da IDGA. Verificou também diversidade entre os isolados quanto ao ciclo de replicação viral *in vitro*, sendo dois líticos nos cultivos celulares.

2.3.7- Ensaios Imunoenzimáticos

2.3.7.1- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) se baseia na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividade tanto imunológica como enzimática. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado

com uma enzima e insolubilizado sobre um suporte, a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e poderá facilmente ser revelada mediante a adição de um substrato específico, que sob ação da enzima produzirá uma cor observável a olho nu e quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro (Roitt et al., 1998).

Segundo Knowles (1997), diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para LVPR, onde são empregados tanto antígenos nativos como recombinantes. Adams et al. (1980a) utilizaram um ELISA indireto (ELISA-i) para verificar a resposta imune de cabras persistentemente infectadas com CAEV. Houwers et al. (1982) desenvolveram um ELISA para a detecção de anticorpos para o MVV com um antígeno parcialmente purificado, compararam com a IDGA e o teste de fixação de complemento (FC), e verificaram que todas as amostras positivas na IDGA, FC ou ambas também foram positivas no ELISA. Em adição, o ELISA detectou mais 11,5% de soropositivos. Schroeder et al. (1985) prepararam um ELISA-i para detecção da CAEV, e verificaram que o ELISA detectou 97,3% dos soropositivos enquanto a IDGA 61%. Entretanto estes autores concentraram o antígeno 1000 vezes. Houwers & Schaake (1987) utilizaram anticorpos monoclonais para p28 do MVV num ELISA sanduíche de bloqueio com dois anticorpos ("*double antibody sandwich blocking - DAS blocking*") e os resultados foram comparados com aqueles obtidos na IDGA e no ELISA-i. A nova técnica, denominada de CTB-ELISA, foi altamente específica e tão sensível quanto IDGA e ELISA-i. Posteriormente, Archambault et al. (1988) usando biotina-avidina e antígeno de CAEV purificado em gradiente de sacarose prepararam um teste de ELISA para detectar anticorpos para o antígeno p28 do CAEV e compararam os resultados do ELISA com radioimunoensaio (RIA). O ELISA desenvolvido foi mais sensível que a IDGA e mais rápido e fácil que o RIA, sendo sugerido como método de escolha para o diagnóstico de infecção pelo CAEV.

Simard & Briscoe (1990) desenvolveram um ELISA-i para detecção de anticorpos contra MVV utilizando um antígeno preparado com o uso de sulfato de sódio dodecyl (SDS), o qual segundo os autores resulta em valores altos da

densidade óptica, e compararam com a IDGA. Dez ovinos foram inoculados com MVV e o título do soro acompanhado por 14 semanas. Todos os ovinos soroconverteram no ELISA-i, enquanto 90% soroconverteram na IDGA. O ELISA-i aplicado num rebanho ovino infectado teve de especificidade 98,8% e um aumento da sensibilidade relativa de 15,5% comparado à IDGA.

Heckert et al. (1992) testaram 511 amostras de soro caprino com objetivo de calcular a sensibilidade e especificidade de um ELISA com antígeno do CAEV e avaliar a concordância com três testes imunológicos (IDGA, *immunoblotting* e imunoperoxidase em células fixadas). Os testes apresentaram uma boa concordância e o ELISA desenvolvido apresentou boa sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizado como um teste confiável para detecção de anticorpos para o CAEV.

O leite foi considerado uma alternativa para o diagnóstico sorológico da CAEV usando o teste de ELISA (Motha & Ralson, 1994). A sensibilidade e especificidade nas amostras de leite comparadas com as do soro, individualmente, foram 96,4 e 97,3% respectivamente. A concordância entre as amostras, de leite e de soro foi de 96,9%. Segundo os autores o leite pode ser usado para prever aproximadamente a prevalência da CAEV no rebanho. Entretanto, a presença de gordura no leite pode induzir, ocasionalmente, resultados falso-positivos.

Rimstad et al. (1994) utilizaram proteínas recombinantes p17 e p28 do CAEV para detectar anticorpos em amostras de soro e de leite caprinos através de ELISA. Três testes de ELISA baseados na p17, p28 e em uma combinação das duas proteínas, foram confrontados com um ELISA em que se empregava como antígeno a partícula viral completa purificada e com o teste de IDGA. Verificou-se alta correlação entre o ELISA da combinação das proteínas recombinantes e o ELISA com vírus completo. Contudo, apenas 72 a 75% das amostras de soro consideradas positivas nestes dois testes de ELISA foram positivas na IDGA. Com relação ao tipo de amostra analisada no teste, o soro permitiu a detecção de anticorpos em um maior número de animais que o leite.

Rosati et al. (1994) desenvolveram, para

deteção de anticorpos para o lentivírus ovino, dois testes ELISA, um preparado a partir da partícula viral completa (ELISA-VC) e outro baseado na proteína transmembrânica recombinante (ELISA TM-r) e foram confrontados com a IDGA. A sensibilidade do ELISA TM-r foi superior a IDGA, mas inferior ao ELISA-VC, particularmente para detecção de anticorpos em estágios iniciais da infecção. Os autores ressaltam que a proteína transmembrânica é um importante marcador imunológico na infecção dos LVPR, mas é pouco representativa em preparações de antígeno convencional, não estando claro se esta proteína do lentivírus ovino cepa K1514 pode ser usada como um antígeno universal para detecção de infecção ovina em diferentes áreas geográficas.

Clavijo & Thorsen (1995b) preparam três testes ELISA baseados na p28, gp40 e em uma combinação das duas proteínas. Os testes foram confrontados entre si e comparados com o teste *immunoblotting*. Verificou-se que o ELISA da glicoproteína transmembrânica (gp40) foi mais imunoreagente que com o da core proteína (p28) reconhecendo maior número de animais soropositivos. Quando o ELISA combinado (p28 e gp40) foi comparado com o *immunoblotting*, verificou-se sensibilidade de 100% e especificidade de 98,3%. Portanto, o ELISA usando ambas proteínas recombinantes parece ser altamente sensível e específico para a detecção de anticorpos contra o CAEV. Kwang et al. (1995) usando as proteínas recombinantes de lentivírus ovino - core proteína (p25) e transmembrânica (gp40) - verificaram que o ELISA da glicoproteína transmembrânica é mais efetivo na detecção de animais soropositivos que o ELISA da core proteína. Observaram, também que o ELISA da gp40 apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes ao ELISA com o vírus total. Entretanto, quando compararam o ELISA do vírus total com um ELISA combinado (p25 e gp40) verificaram que o ELISA combinado apresentou melhores resultados que aquele, e sugeriram a utilização ELISA combinado (p28 e gp40) como rotina no diagnóstico das LVPR.

Zanoni et al. (1995) relatam que ELISA desenvolvidos com proteínas recombinantes apresentam taxas significativas de resultados falso positivos com relação ao ELISA utilizando antígeno altamente purificado do vírus total.

Celer Jr et al. (1998) usando como antígeno a partícula viral completa num ELISA-i compararam a sensibilidade deste teste com a IDGA e observaram que o ELISA-i foi mais sensível que a IDGA, detectando 13% a mais de amostras positivas. A menor sensibilidade da IDGA foi explicada pela necessidade de várias interações epitopo-anticorpo para que se obtenha um resultado positivo. Os autores sugeriram que os animais sejam testados inicialmente por IDGA e que as amostras negativas sejam retestadas por ELISA.

Castro (1998) desenvolveu um ELISA utilizando o sistema de amplificação de sinal avidina-biotina (Lab-ELISA) e comparou com o ELISA indireto e IDGA. Verificou que o Lab-ELISA apresentou maior sensibilidade que o ELISA-i e a IDGA e especificidade semelhante.

Saman et al. (1999) desenvolveram um novo ELISA para detecção de anticorpos para o MVV e o CAEV. Os autores combinaram a proteína p25 do MW produzida em *Escherichia coli* e um peptídeo derivado de uma região imunodominante da proteína transmembrânica gp46. Confrontou-se os resultados do ELISA àqueles obtidos pela IDGA, sendo que a sensibilidade do novo ELISA foi de 99,4% e a especificidade de 99,3%.

2.3.7.2- Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-immunoblotting)

O *Dot-immunoblotting* pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras em razão da presença de ação de antígeno ou anticorpo, ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. Amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose e secas, a seguir a membrana é bloqueada, coberta com anticorpos e analisada por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada, como um método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do *immunoblotting* após a transferência do antígeno para a membrana. Por diluição seriada do antígeno, a sensibilidade de um dado sistema pode ser determinada (Stott, 1989).

O *Dot-Blot* vem sendo utilizado no estudo e diagnóstico de enfermidades tanto humanas como nos animais domésticos em diferentes áreas. Na parasitologia foram desenvolvidos

diversos *Dot-Blot*, dentre eles para Fasciolose (Ibarra et al., 1998), Leishmaniose (Vercammen et al., 1998; Mancianti et al., 1996), Toxoplasmose (Ferreira et al., 1997), Babesiose (Kumar et al., 1997), Toxocara (Camargo et al., 1992), Esquistosomose (Boctor et al., 1987) e Teníase (Draelants et al., 1995).

Com relação as bacterioses foram elaborados *Dot-Blot* para Brucelose em caprinos (Singh et al 2000) e em bovinos (Palmer et al., 1997), Paratuberculose bovina (Bech-Nielsen et al., 1993) e Micoplasmose (Jacobs et al., 1986).

Nas viroses desenvolveu-se *Dot-Blot* para Dengue (Branch & Levett 1999), Sarampo (Vaz de Lima et al., 1994), Varicela (Leonardi et al., 1990), Caxumba (Leonardi et al., 1990), New Castle (Roy & Venugopalan 1999), Raiva (Jayakumar et al., 1996), Língua Azul (Afshar et al., 1992), Adenovirose (Maiti et al., 1993), Rotavirose (Ribas Antunez et al., 1996), Encefalite Oeste Equina (Boctor, et al., 1989).

Recentemente trabalhos foram realizados com retrovírus. Llamas et al. (1999) desenvolveram um *Dot-ELISA* para a detecção de anticorpos contra o vírus da Leucose Bovina enquanto Li et al. (2000) elaboraram um *Dot-ELISA* usando proteínas recombinantes do gene *gag* do HIV e Ozyoruk et al. (2001) utilizaram o *Dot-Blot* para verificar a reatividade de anticorpos monoclonais frente a glicoproteína de superfície (gp 135) do CAEV-63 purificada por coluna de afinidade.

2.3.7.3- *Immunoblotting* ou *Western blotting*

O *immunoblotting*, em princípio, pode ser delineado como método onde proteínas (anticorpos séricos ou plasmáticos) podem ser imobilizadas em uma membrana ou transferidas por capilaridade, difusão ou forças elétricas. As forças de ligação da membrana podem ser de natureza covalente ou não-covalente. O material protéico deve ser separado antes da transferência por eletroforese. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação (Bjerrum & Heegaard, 1988). Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa vem sendo utilizada em LVPR somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas virais dos LVPR.

Torfason et al. (1992) estudando a resposta humoral ao MVV por *immunoblotting*, neutralização (NT) e fixação do complemento (FC), verificaram que de seis bandas identificadas como específicas do vírus, três bandas do gene *gag* e uma do gene *env* foram as primeiras a surgir na infecção juntamente com a detecção de anticorpos na FC. Observaram que a proteína transmembrânica apareceu tardiamente e que após anos ocorre um declínio nos títulos de anticorpos e desaparecimento das bandas não *gag*.

Rimstad et al. (1993) aplicaram as técnicas de IDGA, ELISA e *immunoblotting* na detecção de anticorpos para o CAEV em caprinos e verificaram animais sorologicamente negativos por ELISA e IDGA, mas positivos por PCR. Observaram, ainda que quando as amostras eram negativas por ELISA nenhuma banda foi visualizada no *immunoblotting*. Utilizando uma proteína recombinante do CAEV como antígeno, Rosati et al. (1995) verificaram reações fortes no *immunoblotting* em soros de caprinos clinicamente doentes e que um ELISA-i era mais sensível que o teste de IDGA. Ding & Xiang (1997) estudando a resposta imune para o CAEV, em cabras infectadas experimentalmente, pesquisaram anticorpos, através de ELISA-i e de *immunoblotting*. O *immunoblotting* detectou anticorpos para p28 já aos 4 dias PI, enquanto no ELISA indireto os anticorpos foram detectados 15 a 20 dias PI. Com estes resultados comprovou-se a alta sensibilidade do *immunoblotting* para detecção precoce de anticorpos para o CAEV. Celer Jr et al. (1998) utilizando antígeno elaborado com a partícula viral completa para detecção de animais infectados pelo lentivírus ovino, aplicaram o *immunoblotting* para dirimir resultados discordantes encontrados entre os testes ELISA e IDGA.

Apesar de ser considerado como *gold test* não se conhece a sensibilidade relativa do *immunoblotting* para detecção de anticorpos para LVPR (Knowles, 1997).

2.3.8- Outras técnicas auxiliares no diagnóstico

Os testes de Fixação de Complemento (FC) ou neutralização para detecção de ovinos naturalmente infectados pelo MVV demonstraram resultados menos sensíveis que a IDGA (Klein et al., 1985). Entretanto, Torfason

et al. (1992) encontraram resultados satisfatórios com a FC e fracas na neutralização, provavelmente em decorrência da baixa avidéz destes anticorpos a seus correspondentes epitopos.

Existem, ainda, algumas técnicas laboratoriais que são pouco sensíveis ou não são específicas para o diagnóstico dos LVPR, entretanto podem ser utilizadas no caso da falta ou da dificuldade de realização de testes mais sensíveis embora não possam ser conclusivas no diagnóstico. O exame do líquido sinovial no caso de artrites (Phelps & Smith, 1993; Pinheiro et al., 2000a) e do líquido céfalo-raquidiano (Norman & Smith, 1983) no caso de quadros nervosos podem ser empregados para verificar principalmente a quantidade e o tipo de leucócitos. Apesar de somente auxiliar no diagnóstico das artrites, o índice articular clínico (IAC) é outra ferramenta que os veterinários de campo podem lançar mão para separar os caprinos com aumento de volume articulares.

Os exames anátomo-histopatológico e imunohistoquímico tem sido utilizados para confirmar o diagnóstico de infecções por LVPR pós-morte.

3. ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Em decorrência da diversidade da natureza e dos objetivos do trabalho de tese, os experimentos realizados estão apresentados separadamente cada um contendo sua introdução, metodologia, resultados e discussão. Os dois primeiros experimentos tem um enfoque epidemiológico, sendo que o primeiro reflete a situação da infecção pelo CAEV no estado do Ceará, principalmente levando-se em conta o animal e o rebanho, enquanto o segundo descreve a situação dos criatórios caprinos quanto ao tipo de criação e aos problemas sanitários facilitando o estudo do comportamento epidemiológico da CAE no Ceará. Estes dois trabalhos já encontram-se publicados (Pinheiro et al., 2000 e Pinheiro et al., 2001). Os três últimos experimentos estão ligados a ensaios imunoenzimáticos.

3.1- PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA NO ESTADO DO CEARÁ-BRASIL

3.1.1- Introdução

A Artrite Encefalite Caprina (CAE), causada por lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), acarreta grandes perdas econômicas nos rebanhos caprinos, principalmente naqueles de produção leiteira, afetando animais de diferentes raças, idades e sexos (Dawson, 1989). As perdas econômicas se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso dos adultos devido a dificuldades de locomoção. Perdas indiretas importantes decorrem da desvalorização dos rebanhos, reposição precoce de animais, despesas com medidas de controle e barreiras comerciais para produtos (matrizes, reprodutores e sêmen). No Brasil, sua presença foi constatada inicialmente no Rio Grande do Sul (Moojen et al., 1986). No Ceará, o primeiro registro desta infecção ocorreu em animais de raças leiteiras no município de Sobral (Pinheiro et al., 1989). Em levantamento realizado em rebanhos leiteiros na região metropolitana de Fortaleza - RMF (CE) verificou-se soroprevalência de 40,7% de animais positivos para LVPR (Melo & Franke, 1997).

O efetivo caprino do Ceará é de 795.690 cabeças (IBGE, 1999) composto basicamente por raças nativas da região (nativos) e animais sem raça definida (SRD). A produção de leite de cabra é explorada na região Nordeste de maneira semi-intensiva, exceto nas propriedades rurais situadas próximo aos grandes centros urbanos, onde existe maior número de criatórios com sistema de criação intensivo (Silva, 1996).

No Nordeste brasileiro, levando-se em conta a realidade sócio-econômica e o tipo de exploração zootécnica predominante, a presença de LVPR nos animais leiteiros representa grande risco de disseminação do agente para os rebanhos nativo e SRD. A pouca informação sobre a CAE no País tem limitado a implantação e avaliação de medidas profiláticas, sendo o levantamento epidemiológico da infecção pelo vírus da CAE (CAEV) o primeiro passo para seu controle. Até o presente, todos os trabalhos realizados no Brasil foram em rebanhos de caprinos leiteiros, onde foi comprovada a alta prevalência da infecção. A suspeita de que a introdução de animais, principalmente reprodutores puros e/ou mestiços, sem um devido controle, tenha elevado o risco de contaminação dos rebanhos nativos/SRD, motivou a realização deste levantamento epidemiológico, com ênfase nos rebanhos que apresentam algum grau de melhoramento e nos nativos/SRD.

3.1.2- Material e métodos

A coleta das amostras de soro foi realizada nas várias regiões criadoras de caprinos de raças leiteiras e nativos/SRD do Ceará no período de fevereiro a julho de 1997. Como universo amostral foram selecionadas 130 propriedades através de amostragem não probabilística. O rebanho foi considerado leiteiro quando os animais eram ordenhados regularmente e o leite utilizado para consumo próprio ou comercializado. No caso dos animais nativos/SRD foram escolhidas propriedades nos municípios de maior representatividade para o Estado ou para a microrregião (Figura 4). Foram incluídos somente animais com idade superior a seis meses. Em cada fazenda foram aplicados dois questionários buscando informações gerais sobre a propriedade e o plantel, e individuais dos animais amostrados sorologicamente (anexos 1 e 2).

O número mínimo de amostras a serem testadas (n) foi calculado de acordo com Astudillo (1979), considerando uma prevalência esperada de 2%. Foram amostrados rebanhos caprinos de vários tipos de sistema de criação assumindo um erro amostral de 22% e um grau de confiança de 95% ($z = 1,96$). Assim, foi estabelecido um $n = 3963$, correspondendo a cerca de 30 animais por fazenda, estratificados segundo a composição aproximada dos rebanhos em: 65% de matrizes, 25% de jovens (entre 6 a 12 meses) e todos os reprodutores adultos.

Para detecção de anticorpos contra o LVPR foi utilizada a microtécnica de imunodifusão em gel de ágar (MIDGA) descrita por Gouveia (1994), utilizando antígeno comercial¹ derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus MVV contendo as proteínas: glicoproteína gp135 (envoltório viral) e proteína estrutural p27(capsídeo).

Com base nos resultados sorológicos foram calculadas a prevalência e as frequências nos estratos, para presença de infecção pelo CAEV, objetivando-se verificar a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos para os atributos raça, sexo, faixa etária e tipo racial, utilizando-se o teste Qui-quadrado (χ^2) com o auxílio do programa EPI-INFO (Dean et al., 1992).

3.1.3- Resultados e discussão

Foram estudadas 4019 amostras de soro caprino de 130 criatórios localizados em 30 municípios do Ceará. A prevalência da infecção do CAEV foi de 1% (40/4019 animais) considerando todos os tipos raciais de caprinos testados. Entretanto a prevalência em rebanhos leiteiros foi de 4,6% (37/810), enquanto que em Pernambuco foi de 17,6% (70/397) (Saraiva Neto, 1993), e 29,8%

¹ *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®*, USA. Este kit é composto por 1 mL de antígeno (p28 e gp135) produzido com o MVV, 3 mL de soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp135, 0,5 mL de soro positivo (soro rico em anticorpos contra as proteínas p28 e gp135), 0,5 mL de soro fraco-positivo (soro pobre em anticorpos contra a gp135 e sem anticorpos contra a p28) e soro negativo (soro sem anticorpos contra as proteínas p28 e gp135).

(615/2065) no Estado de São Paulo (Fernandes, 1997). Assis (1994) em estudo sorológico de caprinos provenientes de criatórios de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará verificou presença de anticorpos para LVPR em 33,3% (205/615), 29,7% (30/101), 27,5% (211/768) e 12,8% (15/117) em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Ceará e Bahia, respectivamente. No Rio de Janeiro constatou-se prevalência de 22,9% (22/97) em amostras de soro coletadas no período entre 1982 e 1988 e de 20% (29/145) em caprinos coletados no período entre 1993 e 1994 (Cunha & Nascimento, 1995).

Com relação à prevalência por região do Ceará, constatou-se maior prevalência da infecção (11,1%) na RMF, justamente a maior bacia leiteira caprina. Esta prevalência representou 57,5% dos animais soropositivos encontrados, sendo portanto, a região do estado com o maior número de animais infectados pelo CAEV. Este achado é confirmado por Melo & Franke (1997) que observaram prevalência de 40,7% nos rebanhos leiteiros da RMF. As regiões norte e centro do Estado são outras bacias leiteiras caprinas onde foram encontrados 1,0% e 0,3% de soropositividade, respectivamente. Na região dos Inhamuns, caracterizada quase exclusivamente por criações extensivas e sem introdução de animais de raças leiteiras, como também na região Sul do Estado, não foram observados caprinos reagentes (Tabela 4). O número reduzido de fazendas e animais pesquisados na RMF deveu-se ao fato da prevalência do CAEV esperada nesta região ser alta em função da concentração de rebanhos leiteiros, comprovada por Melo & Franke (1997), o que não ocorreu nas outras regiões.

Analisando a distribuição de caprinos soropositivos nos municípios pesquisados verificou-se que um terço deles (10/30) apresentou pelo menos um rebanho com caprinos soropositivos (Figura 5) e que o município de Fortaleza deteve quase a metade dos animais soropositivos, seguido pelo município de Sobral, um grande município produtor de leite caprino do Ceará. Verificando a percentagem de municípios com animais positivos em relação à totalidade de municípios pesquisados na região observou-se que na RMF 100% dos municípios (2/2) tinham caprinos soropositivos, a região norte 62,5% (5/8), região Central 42,9% (3/7), Inhamuns 0% (0/3) e Sul 0% (0/9).

De acordo com a origem dos caprinos, os animais soropositivos eram procedentes na sua maioria, da RMF (55%), entretanto a introdução de caprinos procedentes de outros estados (22,5%) ou países (10%) contribuíram para disseminação da infecção no Ceará (Tabela 5).

Na distribuição do CAEV por propriedade constatou-se que 9,2% (12/130) das fazendas pesquisadas apresentavam pelo menos um animal positivo no rebanho. Na RMF 66,7% das fazendas apresentavam caprinos soropositivos para CAE, seguida por 12,8% e 7,9% nas regiões Norte e Central, respectivamente. Melo & Franke (1997) estudando a RMF verificaram que 75% das propriedades leiteiras apresentavam caprinos soropositivos enquanto Saraiva Neto (1993), em Pernambuco, verificou soropositividade para CAEV em 70% das propriedades. Assis (1994) pesquisando quatro propriedades leiteiras em Minas Gerais, duas na Bahia e três no Ceará verificou que 100% apresentavam animais soropositivos.

Quanto à idade dos animais soropositivos verificou-se maior prevalência ($p < 5\%$) nos caprinos mais velhos quando comparados com os jovens. Saraiva Neto (1993) relata que animais mais velhos são geralmente de elevado padrão zootécnico, sendo portanto mantidos por mais tempo no rebanho. Os caprinos acima de três anos de idade representaram 32,5% dos animais soropositivos, seguidos de animais de dois a três anos de idade (25%), de um a um ano e meio (20%) de um ano e meio a dois anos (15%) e de seis meses a um ano (7,5%). Os dados encontrados no trabalho corroboram com Fernandes (1997), Saraiva Neto (1993) e Cutlip et al (1992) que verificaram, em São Paulo, Pernambuco e Estados Unidos, respectivamente, taxa de prevalência de animais reagentes aumenta com a faixa etária. Dawson & Wilesmith (1985) relataram maior percentual de soropositividade aos antígenos dos LVPR em caprinos com mais de cinco anos de idade. Entretanto, Melo & Franke (1997), na RMF, verificaram que animais mais jovens apresentaram maior positividade com relação a animais mais velhos, em decorrência da transmissão por leite e/ou colostro. Segundo McGuire (1987), por se tratar de uma enfermidade de evolução lenta e por proporcionar maior probabilidade de exposição dos animais ao vírus é provável que ocorra uma

taxa elevada de reagentes nos animais mais velhos.

A análise por sexo e composição do rebanho (reprodutores, matrizes e jovens) mostrou que tanto os machos como a categoria reprodutores estavam mais afetados ($p < 5\%$) que as fêmeas e matrizes e os jovens (seis a 12 meses de idade), respectivamente (Tabela 6). Estes dados se contrapõem aos de Crawford & Adams (1981), Melo & Franke (1997) e Fernandes (1997) os quais não verificaram diferença ($p > 5\%$) quanto ao sexo e de Saraiva Neto (1993) o qual não verificou diferença com relação à sexo ou composição do rebanho. Entretanto, num estudo realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – EMBRAPA, verificou-se que a maior prevalência ocorreu justamente com os reprodutores (EMBRAPA, 1994). Segundo Crawford & Adams (1981) não existem fatores relacionados ao sexo que predisponham à infecção pelos LVPR. Entretanto, como este trabalho pesquisou um maior número de fazendas formadas por caprinos mestiços oriundos de melhoramento dos rebanhos nativo/SRD, onde são utilizados principalmente reprodutores puros leiteiros ou mesmo mestiços, o número de amostras de caprinos machos com infecção aumentou. Das 26 fêmeas positivas, somente uma encontrava-se numa fazenda com regime extensivo, enquanto que dos 14 reprodutores positivos quatro encontravam-se nesta categoria. Portanto, é provável que os reprodutores sejam a principal fonte de infecção destes rebanhos. Na tabela 6 pode-se verificar que nas raças puras leiteiras o percentual de reprodutores é praticamente o dobro que o percentual de fêmeas e jovens ($p < 5\%$).

Quando levou-se em conta o grau de sangue dos animais, 4,6% (37/810) de raças puras leiteiras e 0,1% (3/2410) dos caprinos mestiços apresentavam anticorpos contra LVPR, enquanto nenhum animal (0/904) nativo/SRD apresentou-se reagente (Tabela 6). Provavelmente uma das causas da menor prevalência nos animais mestiços com relação aos animais puros esteja na formação dos rebanhos mestiços, onde comumente se introduz um reprodutor puro para cobrir as cabras nativa/SRD ou mestiças, o que tem restringido a transmissão vertical. As raças puras leiteiras representaram 92,5% ($p < 0,5\%$) dos caprinos com LVPR. A raça Parda Alpina foi mais

afetada ($p < 5\%$) (8/35) quando comparada com os outros tipos raciais estudados (Tabela 6). Convém salientar que a raça Anglo Nubiana foi a que apresentou o maior número de animais soropositivos, representando 55% dos mesmos. Melo & Franke (1997) verificaram soropositividade em 62%, 21% e 17% dos animais de raças leiteiras, mestiças e SRD, respectivamente. Em Pernambuco, as raças puras e os mestiços representaram 82,9% e 17,1% dos positivos para LVPR. Os animais puros leiteiros agrupados segundo a raça demonstraram frequência de 43,7%, 30,9%, 22,4%, 0% e 0% para as raças Parda Alpina, Toggenburg, Saanen, Anglo Nubiana e Mambriana, respectivamente (Saraiva Neto, 1993). No Estado de São Paulo, Fernandes (1997) verificou-se frequências de 89,4% e 10,6% de soropositivos para o CAEV para as raças puras e mestiças, respectivamente. Analisando a variável raça, observou-se que o número de animais soropositivos da raça Anglo Nubiana (51%) foi significativamente maior ($p < 5\%$) que os das raças Saanen (25,2%), Alpina (36%) e mestiços (23,5%). Nazara et al. (1985), Surman et al. (1987) e Grant et al. (1988) também verificaram maiores prevalências nos rebanhos de raças puras comparados com os mestiços.

Como a principal via de transmissão é via colostro e leite infectados, a fêmea tem papel fundamental na transmissão da infecção. Monicat (1987) relata que a introdução de fêmeas infectadas com LVPR nos rebanhos, acelera a infecção dos mesmos, provavelmente em virtude de fatores, tais como contato íntimo e problemas na ordenha mecânica. Entretanto, a transmissão do lentivírus pelo sêmen deve ser considerada, uma vez que a presença deste no sêmen de machos da espécie caprina naturalmente infectados foi demonstrada pela técnica de PCR (Andrioli et al., 1999) e em ovinos naturalmente infectados e portadores de orquite brucélica (Concha-Bermejillo et al., 1996), e Rowe et al. (1993) observaram maiores taxas de soroconversão em fêmeas cruzadas com machos soropositivos do que naquelas cobertas com machos negativos.

Analisando o tipo racial dos reprodutores verificou-se que as raças Parda Alpina, Anglo Nubiana e Saanen apresentaram, respectivamente, 33,3%, 25% e 5,9% de animais soropositivos, enquanto as outras raças

não apresentaram animais positivos. Este fato, aliado a um maior número de reprodutores da raça Anglo Nubiana (54,5% dos reprodutores positivos), que é a preferida pelos criadores e técnicos no melhoramento de rebanho nativo/SRD, devido a sua adaptação e dupla aptidão, tendem a aumentar a disseminação desta infecção nos caprinos no Ceará.

Com base nos resultados pode-se verificar que o CAEV já se encontra disseminado nas várias regiões do Ceará. A aquisição ou troca de reprodutores com o objetivo de melhoria dos plantéis caprinos, são práticas rotineiras utilizadas pela maioria dos criadores e que facilitam a disseminação do lentivírus, principalmente quando não são utilizadas medidas de prevenção. Por outro lado, a evidência sorológica da presença de LVPR em reprodutores caprinos, associada à recente detecção do vírus no sêmen de caprinos infectados, permitem inferir que a dispersão do agente entre plantéis através da introdução de reprodutores soropositivos ou de sêmen congelado deve ser considerada quando do estabelecimento de programas de controle da CAE em caprinos.

3.2- ASPECTOS ZOO-SANITÁRIOS DA CAPRINOCULTURA CEARENSE

3.2.1- Introdução

Os caprinos desempenham um importante papel econômico em países em desenvolvimento, onde aproximadamente 95% dos animais existentes no mundo são encontrados, fornecendo importantes fontes de carne, leite e fibra. Situação semelhante existe no Nordeste do Brasil (Souza Neto et al. 1996). Os pequenos ruminantes são utilizados no nordeste do Brasil geralmente como fonte de renda para troca, e como uma espécie de seguro contra os períodos de secas. A importância destes não deve ser mensurada somente pelo número de animais ou pelo valor da produção. Em várias fazendas os animais e produtos não são vendidos mas consumidos ao contrário do que acontece com os produtos da espécie bovina que são usualmente vendidos (Relatório Técnico Anual do CNPC, 1989).

Gutierrez et al. (1989) num trabalho em 127 fazendas produtoras de caprinos nas diversas microregiões do Estado do Ceará verificou que a atividade com pequenos ruminantes foi responsável por 26% do total de margem bruta de renda gerada contra somente 8 % de sua participação no total de custos variáveis. Esta atividade gerou cerca de quatro vezes mais margem bruta por unidade de custo variável do que as atividades com bovinos e culturas.

O desenvolvimento da caprinocultura no Nordeste é severamente afetado por inúmeros fatores, entre eles, a alta incidência de problemas sanitários. A criação de caprinos nas regiões semi-áridas brasileiras é caracterizada por práticas de manejo inadequadas, com relação principalmente aos aspectos sanitários, o que interfere sobremaneira na produtividade do rebanho (Simplicio et al., 1981; Azevedo, 1982).

Segundo Oliveira et al. (1995) o que limita a criação de caprinos empresarialmente, segundo opiniões dos criadores são, além dos problemas sanitários, a falta de crédito rural e de pastagem cultivada, entre outras.

O manejo sanitário do rebanho caprino no Nordeste é descrito sucintamente por Tinôco (1983) na Bahia, Baker & Souza Neto (1987)

em caprinos leiteiros no Rio Grande do Norte, Souza Neto (1987) em Pernambuco, Oliveira et al. (1995) nos estados da Bahia, Piauí, Pernambuco e Ceará, e Souza Neto et al. (1996) em Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte.

Caldas et al. (1989) em estudo sobre a ovinocaprinocultura em 2096 propriedades no nordeste da Bahia verificaram que os problemas sanitários são diversos e variados. Expõem, ainda, que as doenças infecciosas e parasitárias constituem sério entrave ao desenvolvimento da ovinocaprinocultura, por representarem parcela considerável das perdas em animais, com grande repercussão econômica. Oliveira et al. (1995) citam que a maioria dos criadores de caprinos entrevistados no Ceará, Bahia, Pernambuco e Piauí relatam o aparecimento freqüente de doenças como uma das principais limitações para a criação. Silva (1996), em estudo realizado nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, relata uma preocupação quanto a problemas administrativos e sanitários no segmento da produção e insumos.

O direcionamento das pesquisas é de suma importância para a relação custo/benefício. Pensando nisto e na carência de trabalhos epidemiológicos, no que concerne à população caprina, aplicou-se um questionário em cada fazenda visitada objetivando conhecer mais detalhadamente o manejo sanitário empregado e, do ponto de vista do criador, os problemas sanitários mais relevantes nos criatórios caprinos do Ceará.

3.2.2 - Material e métodos

O trabalho foi realizado nas várias regiões criadoras de caprinos de raças leiteiras e nativos/SRD do Ceará. A coordenação deste levantamento foi realizada por pesquisadores da área de sanidade do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos - CNPC com o auxílio de técnicos de outros órgãos oficiais (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Ceará - EMATERCE e Secretaria de Desenvolvimento Rural do Estado do Ceará).

Como não existe uma listagem representativa dos criadores caprinos no estado, o que inviabiliza uma amostragem ao acaso, a amostragem não probabilística foi utilizada para selecionar os criadores. A produção de caprinos

foi a única característica pré-determinada requerida para que as fazendas fossem incluídas na amostragem. Como universo amostral foram selecionadas 127 propriedades, algumas destas listadas pela associação de criadores (Clube do Berro) e por técnicos da EMATERCE como criadoras de caprinos leiteiros no Estado do Ceará. O rebanho foi considerado leiteiro quando os animais eram ordenhados regularmente e o leite utilizado para o consumo próprio ou comercializado. No caso dos animais SRD/nativos foram escolhidas propriedades nos municípios apontados pelos técnicos da EMATERCE, como de maior representatividade (número de animais) para o estado ou para a microrregião.

O levantamento estendeu-se de fevereiro a julho de 1997 e foi delineado para verificar aspectos sanitários e dados do manejo sanitário do rebanho caprino. Uma lista de problemas sanitários foram pré-estabelecidos no questionário e este foi aplicado diretamente ao indivíduo responsável pelo rebanho.

Com base nos 127 questionários aplicados (Anexo 2), foi determinado o perfil sanitário da amostra estudada. Para a análise das informações colhidas constituiu-se um banco de dados através da tabulação e codificação, analisado pelo programa EPI-INFO (Dean et al., 1992), estabelecendo-se a frequência de cada variável na amostra levantada.

3.2.3 - Resultados e discussão

O número de animais nos rebanhos caprinos visitados no Ceará variou entre 11 e 1514, com média de 114 animais, número este muito próximo aos 116 animais encontrados por Gutierrez (1981). A Tabela 7 apresenta o número médio de matrizes, reprodutores, cabritos e novilhas.

Verificou-se que na maioria das propriedades o regime de criação é extensivo (77,9%) ou semi-intensivo (19,7%), sendo que as com criação intensiva se resumiram a duas (1,6%). Foi encontrada uma propriedade na qual durante o período seco os animais eram mantidos em regime intensivo e no período chuvoso, com maior disponibilidade de alimentos, em regime semi-intensivo (Tabela 8). Estes dados são semelhantes aos encontrados em três municípios no interior da Bahia (Tinôco, 1983). Magalhães

et al. (1985), em levantamento realizado em criatórios caprinos localizados nos estados do Rio de Janeiro e Minas encontraram 54,2% dos criatórios de caprinos em regime intensivo e 45,8% em regime semi-intensivo. O regime de criação encontrado reflete o nível sócio-cultural dos criadores de caprinos.

Analisando a composição dos rebanhos com relação ao tipo de criação verificou-se que o número de caprinos por rebanho criados extensivamente apresenta média de 98 animais, bem inferior aos rebanhos com criação semi-intensiva (175 animais). O sistema intensivo, em virtude de um número reduzido, composto de duas propriedades, não foi incluído. Na Figura 6 o número de animais foi estratificado por matrizes, reprodutores, crias e fêmeas de recria. Verificou-se que no regime semi-intensivo existe um número bem maior de matrizes, crias e fêmeas de recria quanto comparado com o regime extensivo, cujo objetivo da produção é carne e pele, enquanto os criadores que utilizam os sistemas semi-intensivo ou intensivo exploram principalmente a produção mista (carne/pele e leite) ou produção de leite.

Observou-se que a grande maioria das propriedades visam à produção de carne e pele (77,4%), 18,0% à exploração mista de carne/pele e leite, 3,9% à produção de leite e somente 0,8% a venda de reprodutores e matrizes. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Tinôco (1983) no sertão da Bahia e diferentes dos encontrados por Magalhães et al. (1985) no Rio de Janeiro e Minas Gerais, os quais verificaram que 91,7% dos criadores exploravam a venda de leite, 62,5% de reprodutores, 20,8% de animais para abate e 4,2% de subsistência. A exploração utilizada pelos criadores do Nordeste está mais relacionada a uma exploração de subsistência com baixa adoção de tecnologias e pouco incremento da renda, enquanto nos criatórios das regiões Sul e Sudeste existe maior tecnificação.

Os sinais clínicos apontados como os que mais acometem os caprinos segundo as respostas obtidas estão descritas na Tabela 9. Ressalta-se que estes sinais foram apresentados ao criador num vocabulário adequado ao seu entendimento. Verificou-se que em 81,9% das propriedades foram relatados problemas com

anemia e edema de barbela, sintomas característicos de verminose. Interessante salientar que 14,9% relatam que não tem o problema, entretanto em todas as 19 propriedades os animais são vermifugados. A verminose gastrointestinal é uma doença comum aos rebanhos de caprinos, apresentando prevalência de aproximadamente 99% (Vieira et al., 1998). A diarreia aparece como sinal clínico mais citado (78,7%), provavelmente pelo fato de que esta alteração está intimamente relacionada com verminose e coccidiose, cujo sintoma mais comum é a diarreia, principalmente em animais jovens (Vieira et al., 1998). Em terceiro lugar aparece o aborto em 75,6% das propriedades afetadas. Pododermatite, linfadenite caseosa, ectoparasitoses, mamite, pneumonia, lesões vesiculares de pele, ceratoconjuntivite, distúrbios com sintomatologia nervosa, malformação fetal, criptorquidismo, prolapso de vagina e/ou útero, artrite foram outras alterações citadas.

Entre 2 a 5% dos criadores não souberam informar os dados sanitários do rebanho mesmo quando estimulados a responder. Este fato reforça o desinteresse ou a desinformação sobre dados fundamentais para implementação de uma atividade lucrativa através da caprinocultura.

Caldas et al. (1989) citam as doenças mais frequentes encontradas num levantamento em 1429 propriedades de caprinos no nordeste da Bahia e confrontando os dados pode-se observar que existe similaridade na ordem das doenças, mesmo após o longo período intercorrente entre aquela pesquisa e o presente levantamento. Segundo Silva (1996), foi observado distanciamento entre algumas instituições de pesquisa e os órgãos representativos dos caprinocultores, e que a pesquisa institucional nos últimos 20 anos contribuiu de forma muito tímida com a caprinocultura leiteira no País. Este autor ressalta a importância da inserção dos órgãos de pesquisa de forma a poderem identificar na prática, as demandas imediatas do produtor e assim, direcionar seus projetos de pesquisa para que de fato, esses impactos tecnológicos constituam-se em insumos de grande importância.

Em pesquisa com 31 criadores nos municípios de Quixadá, Tauá, Morada Nova, Mombaça, Pentecoste, Independência e Hidrolândia,

localizados no sertão do Ceará, Oliveira et al. (1995) verificaram que os problemas mais citados foram verminose (93,5%), pododermatite (58,1%) e ectoparasitos (54,8%). Nos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí estes autores verificaram, em ordem de frequência, os seguintes problemas: verminose, ectoparasitoses, diarreia, linfadenite caseosa, pododermatite e ectima contagioso, o que corrobora com os achados deste trabalho.

Magalhães et al. (1985) relatam que os principais problemas encontrados no Sudeste foram verminose (100%), pneumonia (79,2%), mamites (62,5%), ectoparasitos - berne, piolho e sarna (62,3%, 50,0% e 37,5%, respectivamente), artrites (33,4%) e linfadenite caseosa (33,3%). Confrontando estes dados com os deste trabalho verifica-se que alguns problemas incidentes são os mesmos: verminose, aborto e ectoparasitoses, apesar de no caso das ectoparasitoses deve-se diferir alguns problemas como o berne, que não causa problemas no Ceará, em virtude da difícil adaptação deste no ecossistema do estado.

A percentagem média da mortalidade de animais foi de 22,8% e 4,6% para jovens e adultos, respectivamente. Nos jovens, até 12 meses de idade, foram encontradas propriedades com 0 a 100% de mortalidade, enquanto nos adultos, acima de um ano de idade, de 0 a 50%. Na Tabela 10 foram agrupadas as propriedades quanto à mortalidade dos animais. De Boer et al. (1986) em estudo semelhante, em 1980, com 127 fazendas no Ceará verificaram que a mortalidade média foi de 25,8% e 16,1% de animais jovens e adultos, respectivamente. As causas da mortalidade não foram questionadas por estes autores. Souza Neto (1987) encontrou, em rebanhos caprinos leiteiros de Pernambuco, índice médio de 21,6% de mortalidade em animais jovens e 12,1% em animais adultos. Os altos níveis de mortalidade encontrados refletem, uma vez mais, o baixo nível tecnológico e conseqüentemente, de sanidade encontrado nos criatórios caprinos do Nordeste. De uma maneira geral, as práticas sanitárias são pouco usuais nas propriedades produtoras de caprinos (Tabela 11). O corte e tratamento do umbigo é realizado somente em 37,0% das propriedades, sendo o iodo (46,8%) e o "spray repelente de moscas" (23,4%) os produtos mais utilizados. Estes dados, vão de encontro aos observados por De Boer et al. (1986), no Ceará

na década de 1980, onde 70% das propriedades realizavam estas práticas. Isto evidencia um retrocesso no já precário sistema de controle sanitário dos rebanhos. Este retrocesso deve-se em parte a desestruturação da EMATERCE.

Com relação a vacinação do rebanho, 31,7% das propriedades administram algum tipo de vacina sendo as contra febre aftosa (22,8%) e raiva (23,6%) as mais utilizadas. Relata-se, também, a administração de vacinas contra carbúnculo sintomático. Das propriedades que aplicam vacinas 42,5% administram somente contra uma das doenças, 52,5% contra duas e 5% contra três. Souza Neto (1987) encontrou, nos criatórios leiteiros de Pernambuco, 57% de propriedades vacinando contra aftosa e raiva, um índice bem superior aos 32,1% dos rebanhos de exploração leiteira verificados neste estudo. Caldas et al. (1989) verificaram que dos criadores de caprinos no nordeste da Bahia, somente 8,7% realizam vacinação contra raiva/aftosa, 0,4% contra botulismo/ carbúnculo e 0,1% contra linfadenite caseosa. O corte de casco é realizado em 16,5% das propriedades em geral semestralmente (81,0%). A falta da utilização de medidas de controle como o casqueamento pode ser uma das causas da alta incidência de pododermatite (67,7% das fazendas).

A higiene da ordenha é realizada somente em 4,7% das propriedades e consta basicamente da limpeza das tetas das cabras e lavagem das mãos do ordenhador antes da ordenha. Analisando a higiene da ordenha segundo o tipo de exploração verificamos que 40% das propriedades que exploram a produção de leite, 8,7% com exploração mista (carne/pele x leite) e 2% que exploram carne/pele realizam alguma prática neste sentido.

O baixo índice de utilização das práticas de manejo sanitário por parte dos criatórios caprinos contribui, sem dúvida, para a manutenção dos altos níveis de mortalidade e de morbidade observados. A falta de áreas de isolamento e quarentenário nas fazendas e o trânsito entre rebanhos e entre regiões podem ser considerados como os principais responsáveis pela disseminação de doenças. Assis (1994) relata, também, que informações conflitantes e incompletas associadas ao desinteresse dos órgãos públicos e a lentidão no processo e transmissão dos dados disponíveis podem influenciar impossibilitando a

manutenção de vigilância epidemiológica sobre as doenças.

Das 127 fazendas, 35 (27,6%) não tinham nenhuma orientação técnica. Das que dispunham, 81,5% era prestado por órgãos públicos como EMATERCE, EPACE, Embrapa ou INCRA. Foi considerada assistência técnica o acompanhamento feito por veterinários, agrônomos, zootecnistas ou técnicos agrícolas. A frequência deste acompanhamento variava de diária a anual (Tabela 12). No caso da diária esta era realizada pelo próprio dono (técnico de nível médio ou superior) ou em rebanhos de instituições públicas. A visita eventual limitava-se a resolução de problemas na propriedade, quando solicitada à EMATERCE. Souza Neto (1987), em Pernambuco verificou que somente 25% dos criatórios caprinos leiteiros recebiam algum tipo de assistência técnica. É provável que o índice encontrado no presente trabalho esteja mais elevado em decorrência da escolha das propriedades partirem, principalmente, de técnicos da EMATERCE, localizados nas regiões em estudo. Apesar da quantidade de fazendas assistidas ser razoável verificou-se, segundo os proprietários um alto índice de mortalidade, mesmo naquelas onde a assistência era realizada diariamente (Tabela 12).

Na relação entre problemas sanitários e tipo de manejo utilizado, verificou-se que doenças como helmintoses, linfadenite, mamite, pneumonia e principalmente artrite são mais frequentes nos animais criados sob regime semi-intensivo/intensivo do que sob regime extensivo (Figura 7). Magalhães (1985) verificou nos rebanhos caprinos criados no Sudeste em regime intensivo e semi-intensivo, que mamite, artrite e pneumonias são frequentes, reforçando a influência do tipo de exploração e regime de criação no perfil das enfermidades. Silva (1996) relata que o problema sanitário de maior relevância para caprinos ainda é a verminose seguido da artrite encefalite caprina à vírus.

Verificou-se que a grande maioria dos criadores (95,0%) realizam a vermifugação dos animais (Tabela 13). Estes dados são semelhantes aos encontrados por Souza Neto (1996) em caprinos leiteiros nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Oliveira et al. (1995) encontraram a prática de vermifugação em 74%, 75%, 93% e 96% dos criatórios pesquisados no

estado do Ceará, Piauí, Bahia e Pernambuco, respectivamente. Já Magalhães (1985) observou que no Sudeste, 79,1% dos criatórios leiteiros estudados realizam esta prática. Caldas et al. (1989) relatam que no nordeste da Bahia somente 36,5% dos criadores realizam vermifugação dos rebanhos caprinos.

Vinte e um produtos comerciais com nove diferentes princípios ativos foram citados como de uso corrente nas propriedades (Figura 8). Os princípios ativos mais utilizados foram o albendazol e oxfendazol em 47 e 43 propriedades, respectivamente, seguidos pelo ivermectin (24 criatórios) e levamisol (19 criatórios).

Vermífugos de última geração como o doramectin e moxidectin já estão sendo utilizados, porém em um número reduzido de propriedades. O princípio ativo utilizado por propriedade varia de um a quatro sendo mais freqüente a utilização de somente um mesmo princípio ativo (59,2%) repetidas vezes. Esta prática por parte de 30,1% das propriedades é preocupante no controle deste problema, uma vez que a não alternância facilita o aumento da resistência anti-helmíntica (Santiago, 1980).

Outras práticas simples e de baixo custo, que aumentariam a eficácia dos vermífugos e reduziriam o aumento da resistência anti-helmíntica infelizmente não acompanham estes números, tais como: troca de pasto após aplicação do anti-helmíntico, vermifugação do animal recém-chegado à propriedade, confinamento dos animais por 12 horas após a vermifugação, descanso da pastagem com o intuito de reduzir a carga parasitária, separar animais jovens dos adultos e o uso de esterqueiras. Este fato denota falta de informação e, principalmente, problema cultural dos criadores.

Quanto a freqüência de vermifugação no ano pode-se observar que a maioria das propriedades (87,8%) realizam duas a quatro. Este resultado difere daquele verificado por Magalhães (1985), no Sudeste, onde 73,7% vermifugam de quatro a doze vezes por ano. Souza Neto et al. (1996) relatam que os rebanhos leiteiros nos estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte eram geralmente vermifugados apenas uma ou duas vezes por ano. Somente 13,3% das propriedades realizam a vermifugação estratégica, procedimento

baseado em estudo epidemiológico produzido e difundido para a região semi-árida do Nordeste pelo Centro Nacional de Pesquisa de Caprino – Embrapa (Santa Rosa & Vieira, 1989), que consta de três aplicações no período seco e uma aplicação no período chuvoso.

Com relação às ectoparasitoses, os caprinos da maioria das propriedades estudadas são acometidos por pitiríase e pela miíase, e somente cinco propriedades (3,9%) relatam a infestação de carrapatos. Todas as propriedades que relataram a presença de carrapatos tem criação mista com bovinos e se localizam no sertão nas regiões Norte, Inhamuns e Centro do Ceará.

Das propriedades que relataram o problema da pododermatite, somente uma (1,2%) cita ocorrência durante todo o ano, o restante relata o problema no período chuvoso. Quanto à incidência no rebanho, 39,6% mencionam que a maioria dos animais são afetados, 30,2% relatam a metade dos animais e 30,2% que poucos animais são acometidos.

O aborto é descrito em 96 das 127 (75,6%) propriedades. Em 54,2% destas, o aborto ocorre durante todo o ano, 35,4% no período seco e 10,4% no período chuvoso. Provavelmente a principal causa dos abortos no período seco seja de ordem nutricional. Segundo estudo de Silva & Silva (1983) na região semi-árida do nordeste, onde foram acompanhadas 153 cabras adultas por um período de três anos, criadas em pastagem nativa recebendo somente sal comum, verificou-se 51 abortos e através de exames hematológicos e bioquímicos concluiu-se que os abortos foram observados em decorrência dos baixos níveis de proteína e de minerais (micro e macroelementos). Quanto ao grau de acometimento das matrizes, a maioria das propriedades (61,5%) relata um baixo número de casos ou evento raro, 18,8% relatam de 10 a 40% e 19,8% acima de 40% de casos. Segundo Caldas et al. (1989) em 41,5% das propriedades de caprinos pesquisadas no Nordeste na Bahia foram relatados problemas de aborto.

A linfadenite caseosa e a mamite foram citadas em 66,9% e 51,2% das propriedades, respectivamente, a primeira acometendo os animais durante todo o ano, não ocorrendo predileção pelo período seco ou chuvoso. Apesar dos criadores relacionarem a hipertrofia do gânglio linfático à linfadenite caseosa, vale

salientar que nem todo aumento deve ser atribuído ao agente *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Em estudo realizado nos rebanhos caprinos dos estados do Piauí e Ceará através da palpação de gânglios externos em 1142 caprinos, verificou-se que 319 animais (28%) apresentavam abscessos nos linfonodos, entretanto somente em 91(28,5%) destes animais o agente da linfadenite caseosa foi identificado (Silva & Silva, 1982).

Foram considerados sinais clínicos de mamite clínica alterações visíveis no leite e na consistência da glândula mamária. A mamite apareceu durante todo o ano, entretanto, em quatro propriedades, foi relatada maior incidência no período chuvoso quando comparada com o período seco, provavelmente em decorrência do aumento da produção láctea levando a um maior número de casos ou até mesmo pelo aumento de vetores como moscas. A falta de higiene da ordenha - somente 4,7% dos criatórios realizam as práticas - é outro fator que aumenta a incidência de mamite. Neste estudo observou-se o problema em 80% das propriedades leiteiras, 50% com exploração mista (carne/pele x leite) e 52,7% das propriedades que exploram carne/pele, demonstrando sua relação com o tipo de exploração do rebanho. Com relação à linfadenite (externa) e a mamite, 60% e 89,2%, respectivamente, dos entrevistados relataram baixa ou rara incidência no rebanho.

Os criadores relataram a ocorrência de pneumonia e de lesões vesiculares de pele durante todo o ano concentrando-se no período chuvoso com frequência de 63% e 47%, respectivamente. Em estudo realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos, em Sobral-CE, onde foram necropsiados 205 animais num período de 12 meses verificou-se que 55 (26,8%) apresentavam pneumonia (Relatório Técnico Anual do CNPC, 1989). Das lesões vesiculares de pele a mais comum é o ectima contagioso, entretanto três propriedades relataram problemas com febre aftosa acometendo bovinos e um número reduzido de pequenos ruminantes. Destas fazendas somente uma realiza vacinação contra febre aftosa.

Somente 11 propriedades relataram problemas com artrite. Convém salientar que este problema é concentrado principalmente nos animais criados sob regime semi-intensivo/intensivo.

Magalhães (1985) verificou frequência de 33,4% em rebanhos caprinos criados intensiva ou semi-intensivamente nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Sintomas nervosos são relatados em 26% das propriedades pesquisadas, e recaíram principalmente no período de estiagem se caracterizando basicamente pela sintomatologia da intoxicação pela *Ipomoea asarifolia* (salsa), a qual causam distúrbios por alterar o metabolismo da glicose (Pinheiro & Santa Rosa, 1996). Uma propriedade relatou problema de raiva. Esta fazenda encontra-se localizada numa região de muitas grutas, *habitat* de morcegos. Interessante ressaltar que esta propriedade efetua vacinação contra esta doença.

3.3. ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES, EM CAPRINOS.

3.3.1- Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma importante infecção em caprinos, causada por retrovírus, não oncogênico, da subfamília Lentivirinae, resultando primariamente em artrite crônica nos adultos jovens, e leucoencefalomielite em cabritos. Mamite e pneumonia intersticial podem, também, estar associados a esta enfermidade. Esta doença é persistente, progressiva e debilitante, e segundo McGuire et al. (1990), existem várias cepas deste lentivírus diferindo na virulência e antigenicidade.

As perdas econômicas são decorrentes de falhas reprodutivas, morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e da duração do período de lactação, e perda de peso dos animais (Greenwood, 1995). Se por um lado a manutenção de animais infectados no rebanho representa sérias perdas econômicas o sacrifício de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, pois grande parte do rebanho pode estar acometida, além de representar perda expressiva de material genético. Desta forma, tem sido implantados programas de controle da transmissão desta enfermidade, visando à obtenção de crias destes animais enfermos antes de descartá-los.

O controle da CAE baseia-se no teste sorológico dos animais, seguido de separação ou sacrifício dos soropositivos, associado a medidas de manejo que visam a separação precoce das crias, alimentadas artificialmente com colostro e leite tratados termicamente ou sucedâneos do leite (Embrapa, 1994; Gouveia et al., 1994).

A eficiência dos programas sanitários de controle da CAE depende da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial e no monitoramento sorológico das medidas implantadas, da frequência de sua utilização e no manejo utilizado no rebanho. Para realização periódica de testes sorológicos dos rebanhos, a técnica de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é

empregada mundialmente como método de triagem e monitoramento das fases iniciais de programas de controle, mas apesar da boa especificidade, a IDGA pode apresentar resultados falso-negativos (Knowles, 1997). Testes com maior sensibilidade devem ser utilizados quando ocorrer redução substancial da quantidade de animais soropositivos, testados por IDGA, e ainda, quando a taxa de soroconversão no rebanho, apesar de baixa, for mantida (EMBRAPA, 1996a). Segundo Schroeder et al. (1985), a IDGA não é muito sensível e gasta-se muito tempo para sua realização, principalmente em grande quantidade de amostras. Em decorrência, distintas modalidades de testes imunoenzimáticos (*enzyme linked immunosorbent assay* - ELISA) têm sido desenvolvidos para a detecção de anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), utilizando antígenos nativos ou recombinantes (Knowles, 1997).

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e padronização de teste de ELISA indireto (ELISA-i) para a detecção de anticorpos, em caprinos, contra LVPR, utilizando antígeno experimental preparado a partir do vírus total, de forma comparativa com a IDGA utilizando antígeno comercial, buscando alcançar um teste com custo compatível para testar grande número de animais, disponibilidade permanente sem necessidade da importação dos *kits* de imunoreagentes, e praticidade, para que, em associação com outras técnicas, venha a ser utilizado no monitoramento das medidas sanitárias do Programa de Controle do Programa de Controle dos LVPR em desenvolvimento e avaliação desde 1994 no rebanho ovino e caprino do CNPC - Centro Nacional de Pesquisa em Caprinos, o qual visa estabelecer medidas sanitárias padronizadas para aplicação em modalidades epidemiológicas distintas (Embrapa, 1994; Gouveia et al., 1994, Embrapa, 1996a).

3.3.2- Material e métodos

Cultivo de células

Para produção de suspensões e titulações do lentivírus caprino (LVC), foram utilizados cultivos secundários de células de membrana

sinovial caprina (MSC) obtida por "explant" a partir de cabrito comprovadamente negativo para LVPR, seguido de subcultivos por tripsinização das células (Abreu, 1996) em um número limitado a 17 passagens.

Virus e suspensão viral

Na produção da suspensão viral utilizou-se amostra padrão (CAEV-Cork²) do LVC com título inicial de $10^{5,3}$ TCID₅₀/mL. Monocamadas semiconfluentes (70 a 90% de confluência) de MSC (11ª passagem) cultivadas em garrafas roller de 830 cm² de superfície de cultivo, foram inoculadas, 72 a 96 horas após passagem com 15 mL de suspensão viral com 200 DFS/mL diluída em meio essencial mínimo (MEM) sem soro fetal bovino (SFB). Após 60 minutos adicionaram-se 135 mL de MEM com 5% de SFB. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa, sendo observadas diariamente. Coletou-se o sobrenadante semanalmente por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamadas. Os sobrenadantes coletados, bem como as garrafas na última coleta foram congelados a -80°C para posterior titulação e produção do antígeno.

Titulação do vírus

Suspensões virais foram tituladas em microplacas, por diluições decimais em MEM sem SFB, utilizando-se oito repetições por diluição. A cada 50 µL da diluição viral foram adicionados 50 µL da suspensão de células de MSC obtidas por tripsinização, contendo $3,0 \times 10^4$ células/cm² em MEM com 10% de SFB. Foram mantidos poços como controle positivo (células de MSC, MEM e LVC de título conhecido) e negativo (células de MSC e MEM). As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 14 dias com observação diária do efeito citopático (ECP) característico, e após este período, foram fixadas em metanol e coradas com cristal violeta a 0,1%. O título, calculado segundo Reed & Muench (1938), foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou, 14 dias após inoculação, sincícios em 50% dos poços inoculados, correspondendo a uma dose formadora de sincício (DFS) (Castro, 1998).

Purificação do vírus e produção do antígeno

Na produção do antígeno, os sobrenadantes das coletas iniciais e o conteúdo das garrafas congeladas sofreram dois ciclos de congelamento e descongelamento e foram clarificados por centrifugação a 3300 g (4500 rpm em rotor Sorvall GSA ou AH-629) a 4°C por 20 minutos. A suspensão clarificada foi precipitada com PEG-8000 a 40% até a concentração final de 8%, por 18 h a 4°C, sob lenta agitação, seguida de nova centrifugação a 4°C a 12000g (8500 rpm em rotor Sorvall GSA ou 10000 rpm rotor Sorvall SS-34) por 60 min (Reis & Leite, 1994). O sedimento foi suspenso em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0 mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral e foi ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42000g (18000 rpm em rotor Beckman SW 50.1) por 120 min a 4°C (Houwens et al., 1982). O sedimento foi suspenso em PBS (0,05M; 0,15M NaCl; pH 7,4) contendo 2×10^{-4} mol/L de phenylmethylsulphonyl fluoride³ (PMSF). A concentração de proteína total foi determinada (Lowry et al., 1951) e o antígeno mantido a 4°C, sem glicerina, até a realização dos ensaios imunoenzimáticos.

Controle negativo

Com o objetivo de verificar a influência das proteínas celulares na especificidade do ELISA, o controle negativo (antígeno de cobertura negativo) foi preparado com células de MSC submetidas ao mesmo processo, sendo a única diferença no momento da inoculação viral, onde receberam apenas meio de cultura. O processo de concentração foi o mesmo aplicado nas células infectadas.

Produção do conjugado

Imunoglobulinas do isotipo IgG foram obtidas por precipitação de soros caprinos normais em solução saturada de sulfato de amônio, sob agitação constante e refrigeração. Após agitação, *overnight*, a 4°C, centrifugou-se por 45 minutos a 3000 rpm (2100 g) e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em

² Amostra viral gentilmente cedida pela UFRPE, oriunda do *Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants* - INRA - ENVL - France.

³ Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) Sigma. Cat. N° P 7626

PBS, e dialisado⁴ em PBS diluído 10 vezes por 48 horas com seis trocas do PBS. Na última troca da diálise, *overnight*, utilizou-se PBS não diluído (McKinney & Parkinson, 1987).

Para purificação das IgG utilizou-se a cromatografia por afinidade em coluna contendo, como fase estacionária, proteína A imobilizada em sefarose CL-4B pelo método do brometo cianogênico⁵. A proteína total foi dosada (Lowry et al., 1951) e a IgG purificada foi liofilizada.

O soro hiperimune foi obtido por inoculação de coelhos jovens, segundo Hurm & Chantler (1980), por via subcutânea, com 1,0 mg de IgG caprina emulsificada em adjuvante completo de Freund. Após 30 dias, os animais receberam mais três aplicações de 1,0 mg de IgG emulsificada em adjuvante incompleto de Freund, intervaladas de 21 dias, quando se verificou a titulação dos soros por ELISA. As IgG do soro obtido do coelho foram precipitadas em solução saturada de sulfato de amônio e purificadas, por afinidade, numa coluna anti-IgG de coelho. A conjugação das IgG coelho anti-caprino, com peroxidase⁶, foi realizada através do método do periodato (Nakane & Kawoi, 1974).

Técnica do ELISA indireto

Otimização das concentrações dos reagentes

Antígeno - Foram testadas cinco diferentes concentrações de proteína do antígeno viral e da suspensão celular negativa, variando de 2,0 a 0,125 µg/mL. A concentração ótima para o antígeno viral foi determinada pela mais baixa concentração que pode demonstrar a positividade da reação para qualquer diluição do soro padrão positivo e que não foi significativamente menor que a produzida pela concentração imediatamente superior. O antígeno celular (controle negativo) foi diluído nas mesmas concentrações e apresentou valores médios de absorvância iguais ou inferiores aos apresentados pelo antígeno viral frente aos controles de soro negativo e de tampão diluente,

quando testado contra as mesmas diluições do soro padrão positivo.

Soro e conjugado - Foram testadas quatro diluições de soros (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) frente a uma diluição ótima (1:1500) do conjugado IgG coelho anti-cabra determinada por titulação do conjugado frente a IgG caprina, por ELISA direto. A diluição ótima do soro foi determinada pela diluição mais baixa do soro padrão positivo associada à diluição do conjugado de 1:1500, que demonstrou a positividade da reação para concentração ótima do antígeno. Concomitantemente, avaliou-se a ausência de reatividade do soro padrão negativo para as mesmas diluições.

Controle de qualidade e repetibilidade do teste

De um modo geral, foram seguidas as determinações da OIE/FAO (Wright et al., 1993) na padronização e realização do ELISA-i com o intuito do controle de qualidade e repetibilidade do teste. Foram incluídos controles positivo (*pool* de soros fortemente positivos na IDGA), negativo (*pool* de soros negativos de rebanhos livre da CAE) e de conjugado (somente tampão de incubação). Os soros foram testados em duplicata, sendo que os resultados expressos em densidade óptica (DO), foram transformados em porcentagem do resultado médio de quatro repetições com o soro controle positivo, resultando numa escala de zero a 100 (percentual de positividade - PP). Resultados negativos e superiores a 100 foram considerados zero e 100%, respectivamente.

O teste foi conduzido em microplacas de polivinil de alta capacidade de adsorção, flexíveis, com 96 poços⁷. A sensibilização foi realizada com 100 µL contendo 0,5 µg de Ag em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) por 4 horas a 37°C ou 1 hora a 37°C e *overnight* sob refrigeração, em câmara úmida. Após a incubação lavou-se duas vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%, 0,05% de Tween 20). Os sítios livres de ligação de proteínas porventura presentes foram bloqueados pela adição do tampão (PBS, 2% de caseína) e incubação a 37°C em câmara úmida, por 60 minutos, seguida de lavagem por duas vezes. Foram distribuídos na placa, 100 µL dos soros teste, em duplicata, e dos soros controles positivo e negativo (em quadruplicata), diluídos 1:50 em tampão de

⁴ Membrana de diálise com *cut-off* de 10 kDa
Dialysing tubing 3787-D10 Thomas Scientific,
USA.

⁵ Protein A sepharose CL-4B - Pharmacia Biotech.
Cat. N° 17-0780-01

⁶ Peroxidase - Sigma. Cat. N° P 8375

⁷ Placas Microtest III - Falcon / USA. Cat. N° 3912

incubação (PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20), onde permaneceram por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após a lavagem (seis vezes) distribuiu-se 100µL do conjugado anti-IgG caprina marcado com peroxidase na diluição ótima (1:1500) em tampão de incubação e manteve-se por 60 minutos à 37°C, em câmara úmida. Lavou-se novamente a placa por seis vezes e as reações foram reveladas pela adição de 100µL do substrato, uma solução de 0,2 mg/mL de *o*-phenylenediamine (OPD) e 0,02% de H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 5,0), por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi inibida por adição de 20 µL de H₂SO₄ (diluído 1:20). A intensidade da cor da reação foi determinada por absorbância em leitor de microplacas de Elisa⁸ em 492nm de comprimento de onda.

Soros

Para definição do ponto de corte (DO+3 Desvios Padrões) do ELISA-i, foram selecionados 56 soros de caprinos de dois rebanhos sem raça definida (SRD), negativos para detecção de anticorpos para LVC pela IDGA, oriundos da região tradicionalmente caracterizada pela criação extensiva. Para a comparação dos testes foram utilizadas amostras do Banco de Soros do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária - UFMG (273 soros) e de duas fazendas do estado do Ceará (54 soros).

IDGA

Foi utilizada a microtécnica de IDGA descrita por Gouveia (1994) realizada em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30 µL tanto de soro como de antígeno comercial⁹, derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus ovino contendo as proteínas: glicoproteína gp135 (envoltório viral) e proteína estrutural p27(capsídeo), com a leitura realizada 48-72 horas após, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura.

Validação do ELISA

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos no ELISA-i, tomando como padrão o teste de IDGA utilizando antígeno comercial. Foram avaliados as sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e negativo, e eficiência (habilidade do teste identificar corretamente todos os indivíduos positivos e negativos). Os resultados dos testes foram comparados através do teste de qui-quadrado com correção de Yates (χ^2) (Tyler & Cullor, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos dois testes.

3.3.3- Resultados e discussão

As células de MSC (Figura 9), infectadas com 200 DFS/mL, apresentaram os primeiros sinais de infecção 48 a 72 horas após, com a formação de sincícios caracterizados por células gigantes multinucleadas (Figura 10).

O antígeno produzido a partir de suspensão viral com título de 10^{5,8} TCID₅₀/mL apresentou concentração protéica de 2,21mg/mL. Testou-se este antígeno na IDGA frente ao soro padrão anti-MVV/CAEV¹⁰ e o mesmo apresentou duas linhas de difícil visualização, o que inviabilizou sua utilização na IDGA. Observação semelhante foi constatada por Abreu (1996) com o antígeno precipitado por PEG. Entretanto, Castro (1998) verificou a presença de duas fortes linhas de precipitação.

O ELISA-i foi padronizado no sentido de se obter diferença máxima entre as DO de soros negativos e positivos. Avaliando a concentração de antígeno versus a diluição do soro verificou-se que 0,5µg de proteína/poço e a diluição de 1:50 do soro apresentaram melhores resultados (Figura 11).

Para determinação do ponto de corte utilizou-se a média da percentagem da DO de 56 soros de animais negativos pela IDGA, oriundos de rebanhos seguramente livres do LVC, mais três desvios padrões. De acordo com estes critérios o ponto de corte foi de 11,73% de positividade (Tabela 14), o qual é inferior ao observado por Castro (1998) para o ELISA-i e semelhante aos obtidos por Rimstad et al. (1993) com proteínas

⁸ Espectrofotômetro Multiskan -MS, Labsystems.

⁹ Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA.

¹⁰ Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA.

recombinantes. O percentual de positividade do ELISA dos soros negativo e dos animais positivos para IDGA está apresentado na Figura 14.

Verificaram-se as reações imunogênicas dos soros positivos e negativos (diluição de 1:50) frente a um controle celular não infectado. A diferença entre as DO dos soros positivos e negativos foi zero ou negativo nas várias concentrações de proteína do cultivo de células de MSC indicativo que não existiu interferência das proteínas celulares nos resultados obtidos (Figura 12).

Testou-se no ELISA, em quadruplicata, os reagentes do *kit* comercial e um *pool* de soros positivos (Figura 13) e verificou-se que o soro reagente do *kit*, com anticorpos contra a gp135, não foi considerado positivo. Baseado nisto, pode-se inferir que o ELISA-i, apesar de ser produzido com o vírus total, não possui provavelmente concentração de gp135 suficiente para a sua detecção pelo soro padrão reagente. Corroborando com este achado, Celer Jr. et al., (1998) verificaram, por *immunoblotting*, que a gp135 só foi evidente em soros extremamente positivos e, portanto, não a utilizaram para confirmação de diagnóstico. Ramirez et al., (1992), trabalhando com HIV verificaram que as nucleoproteínas (p24) são mais estáveis no *immunoblotting* que as glicoproteínas de superfície (gp120) e transmembrânica (gp41). As glicoproteínas são relativamente instáveis e passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção de antígeno (Rimstad et al., 1994), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde podem ocorrer perdas de até 50% destas proteínas virais (McGrath, et al., 1978), ou até mesmo perdas espontâneas das partículas virais liberadas depois de vários dias de cultivo (Castro, 1998). O soro padrão do *kit* comercial foi preparado para detectar anticorpos contra a gp135 do MVV, e apesar de existir uma boa relação antigênica entre proteínas (Gogolewski et al., 1985), deve-se levar em conta que as amostras de soros foram coletadas em diferentes fases de infecção, e a existência de diferenças genéticas e antigênicas entre os LVPR (Leroux et al., 1996; Reischak, 2000), além do que o soro do *Kit* era heterólogo, o que reduziu a sensibilidade (Knowes et al., 1994).

Consubstanciado no ponto de corte encontrado verificou-se que o ELISA-i detectou 209 animais positivos enquanto a IDGA detectou 144.

A IDGA foi escolhida como teste padrão para o diagnóstico sorológico de infecção por LVC, por ser o teste recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico sorológico de infecção por LVPR para comercialização internacional de pequenos ruminantes (OIE, 1996) e por ser utilizada em programas de controle e erradicação da infecção tanto no Brasil (Gouveia et al., 1994) como no exterior (Knowles, 1997).

Na comparação da IDGA com o ELISA-i (tabela 16) verificou-se: 65,6% de sensibilidade, 94,1% de especificidade, 95,1% de valor preditivo positivo, 60,7% de valor preditivo negativo, 75,8% de concordância e 0,53 de índice Kappa.

O Elisa-i utilizando o vírus completo da amostra CAEV-Cork mostrou ser superior ao teste IDGA com os antígenos do *kit* comercial contendo as proteínas p28 e gp135 do vírus ovino. O protocolo desenvolvido apresentou bom rendimento, utilizando somente 0,5µg/poço de antígeno e uma diluição de 1:1500 de conjugado, aliado à boa resolução e baixa reação inespecífica. Comparando este protocolo de Elisa-i com relação à IDGA verificou-se que detectou 44,5% mais animais positivos, enquanto Castro (1998), Simard & Briscoe (1990) e Celer Jr et al. (1998) comparando os mesmos testes verificaram 25,4% e 15,5% e 15,5%, respectivamente. Entretanto, utilizando o ELISA com sistema de amplificação do sinal enzimático pelo sistema avidina-biotina, Castro (1998) detectou cerca de 84% a mais que o teste IDGA, porém com um aumento do custo e do tempo do teste.

A variedade entre os resultados entre os testes (IDGA x ELISA) neste caso deve ser justificada não somente na diferença da sensibilidade, mas também na composição dos antígenos usados. O principal componente diagnóstico do teste IDGA do *kit* comercial é a gp 135, enquanto o do antígeno deste ELISA-i é a proteína p28. Dados semelhantes foram observados por Heckert et al. (1992) e Celer Jr et al. (1998). A diferença de sensibilidade observada entre os dois testes pode ser indicativa de flutuação da resposta imune contra proteínas codificadas

pelos genes *gag* e *env* durante a evolução da doença (Houwens & Nauta, 1989; Hanson, et al., 1996). Existe, portanto a necessidade para testes sorológicos, de uma combinação de antígenos tanto do capsídeo como do envelope dos LVPR (Boshoff et al., 1997). Uma pequena quantidade de sobrenadante, concentrado 50 vezes por ultrafiltração¹¹, foi testada pela IDGA, que tinha como componente principal a proteína *gag* p28, com parte dos soros utilizados (150 animais) e verificou-se 100% de especificidade com o ELISA-i, confirmando as flutuações da resposta imune citada (dados não publicados).

Existem, ainda, casos de animais tornarem-se soronegativos. Perk (1999) relata um caso de duas cabras inicialmente com alto nível de infecção tornarem-se soronegativas em decorrência dos vírus, em estado de latência, se encontrarem fora do alcance do sistema imunológico, em partículas intracitoplasmáticas tipo A nas células gliais. Casos como este foram relatados em humanos infectados com HIV após tratamento com coquetel antiviral (Wong et al., 1997).

A menor sensibilidade da IDGA a despeito da diferença na produção de anticorpos pode ser explicada em parte pelo mecanismo de interação antígeno-anticorpo. Embora os testes imunoenzimáticos requeiram a ligação de somente um simples epitopo para obter um resultado positivo, a precipitação em gel de ágar requer interações múltiplas antígeno-anticorpo. Pequenas alterações antigênicas na gp 135 podem desta forma influenciar a sensibilidade do teste de IDGA. Este efeito juntamente com o requerimento de grandes quantidades de moléculas reagentes de antígeno e anticorpo é a causa mais comum da limitada sensibilidade do teste de IDGA (Celer Jr et al., 1998).

Chebloune et al. (1996) relatam um número significativo de animais infectados com sorologia negativa (falsos negativos), mas deve ser considerado que a resposta imune contra LVPR apresenta variações individuais (Rimstad et al 1994). Em decorrência de uma maior sensibilidade o ELISA-i desenvolvido mostrou-se um teste mais viável que a IDGA para utilização no controle desta infecção).

Em decorrência da alta mutabilidade dos LVPR, Pasick (1998) relata que a eficiência do teste de reação de cadeia de polimerase (PCR) está intimamente dependente do *primer* e *template* utilizados e evidencia o ELISA com antígenos nativo e, principalmente aqueles que utilizam proteínas recombinantes das duas regiões (*env* e *gag*), como o melhor teste para o diagnóstico destes vírus. A análise estatística entre os resultados da IDGA e do ELISA-i não mostrou uma concordância perfeita, fato também observado por Celer Jr et al. (1998). Tem sido recomendada a realização de um teste inicial de IDGA com posterior reteste dos animais negativos utilizando o ELISA-i e podendo-se, ainda, associar com *immunoblotting* dos animais duvidosos (Celer Jr et al., 1998). A composição final do antígeno é influenciada pelo tipo de técnica de produção. Uma alternativa buscando redução da perda das glicoproteínas é a utilização de técnicas de cromatografia (McGrath, et al., 1978), dentre elas, por afinidade para purificação do antígeno.

¹¹ Ultrafilters com membrana de *cut-off* de 10Kda. AMICON - MILLIPORE

3.4 - DOT-BLOT PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES, EM CAPRINOS.

3.4.1 - Introdução

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma infecção causada por lentivirus e encontrada em todos os continentes (Adams et al., 1984) com alta prevalência nos rebanhos mais tecnificados para a produção leiteira (Rowe & East, 1997), causando consideráveis perdas econômicas para a produção caprina (Greenwood, 1995).

O controle da CAE baseia-se no teste sorológico dos animais, seguido de separação ou sacrifício dos soropositivos, associado a medidas de manejo que visam a separação precoce das crias, alimentadas artificialmente com colostro e leite tratados termicamente ou sucedâneos do leite (EMBRAPA, 1994; Gouveia et al., 1994). Devido aos custos menores e à praticidade, os métodos sorológicos são largamente usados na detecção de anticorpos contra os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), sendo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ELISA os mais usados. Estes testes podem diferir no método de preparação do antígeno ou na cepa de vírus usada e desta forma no conteúdo e espectro de proteínas virais (Celer Jr. et al., 1998).

Existe um interesse crescente no diagnóstico sorológico dos LVPR usando técnicas rápidas, simples e de baixo custo. O *Dot-Blot* (DB) é um teste atrativo para aplicação de rotina, em virtude dos procedimentos permitirem a realização de dezenas de ensaios em tira de nitrocelulose para detecção de anticorpos com alta sensibilidade. Apesar destas qualidades não existe nenhum trabalho na literatura referente à utilização deste teste no diagnóstico dos LVPR.

Este trabalho tem como objetivo padronizar o teste DB para a detecção de anticorpos, em caprinos, contra LVPR, utilizando antígeno experimental preparado a partir do vírus total de forma comparativa com a IDGA utilizando antígeno comercial e com ELISA indireto (ELISA-i), buscando alcançar um teste com custo compatível, para testar, com praticidade, grande número de animais.

3.4.2 - Material e métodos

Produção do antígeno

Na produção de suspensões e titulações do LVC foram utilizados cultivos secundários de células de membrana sinovial caprina (MSC) obtida por "explant" a partir de cabrito comprovadamente negativo para LVPR, seguido de sub-cultivos por tripsinização das células (Abreu, 1996) em um número limitado a 17 passagens.

Para a produção da suspensão viral, utilizou-se amostra padrão (CAEV-Cork¹²) do LVC com título inicial de $10^{5.3}$ TCID₅₀/mL. Monocamadas semiconfluentes (70 a 90% de confluência) de MSC (11ª passagem) cultivadas em garrafas *roller* foram inoculadas, 72 a 96 horas após passagem com 15 mL de suspensão viral com 200 DFS/mL diluídas em meio essencial mínimo (MEM) sem soro fetal bovino (SFB). Após 60 minutos adicionaram-se 135 mL de MEM com 5% de SFB. As garrafas foram incubadas a 37°C, em estufa, sendo observadas diariamente. Coletou-se o sobrenadante, semanalmente, por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada. Os sobrenadantes coletados, bem como as garrafas na última coleta foram congelados a -80°C para posterior titulação e produção do antígeno.

As suspensões virais foram tituladas em microplacas, por diluições decimais em MEM sem SFB, utilizando-se oito repetições por diluição. A cada 50µL da diluição viral foram adicionados 50µL da suspensão de células de MSC obtidas por tripsinização, contendo $3,0 \times 10^4$ células/cm² em MEM com 10% de SFB. Foram mantidos poços como controle positivo (células de MSC, MEM e LVC de título conhecido) e negativo (células de MSC e MEM). As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 14 dias com observação diária do efeito citopático (ECP) característico, e após este período, foram fixadas em metanol e coradas com cristal violeta a 0,1%. O título, calculado segundo Reed & Muench (1938), foi definido como a recíproca da maior diluição que apresentou, 14 dias após inoculação, sincícios em 50% dos

¹² Amostra viral gentilmente cedida pela UFRPE, oriunda do *Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants* - INRA - ENVL - France.

poços inoculados, correspondendo a uma dose formadora de sincício (DFS) (Castro, 1998).

Na produção do antígeno, os sobrenadantes das coletas iniciais e o conteúdo das garrafas congeladas sofreram dois ciclos de congelamento e descongelamento e foram clarificados por centrifugação a 3.300 g (4500 rpm em rotor Sorvall GSA ou AH-629) a 4°C por 20 minutos. A suspensão clarificada foi precipitada com PEG-8000 a 40% até a concentração final de 8%, por 18 h a 4°C, sob lenta agitação, seguida de nova centrifugação a 4°C a 12000g (8500 rpm em rotor Sorvall GSA ou 10000 rpm rotor Sorvall SS-34) por 60 min (Reis & Leite, 1994). O sedimento foi suspenso em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0 mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral e foi ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42000 g (18000 rpm em rotor Beckman SW 50.1) por 120 min a 4°C (Houwers et al., 1982). O sedimento foi suspenso em PBS (0,05M; 0,15M NaCl; pH 7,4) contendo 2×10^{-4} M de *phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF). A concentração de proteína total foi determinada (Lowry et al., 1951) e o antígeno mantido a 4°C até a realização dos ensaios imunoenzimáticos.

Controle negativo

Um controle negativo (antígeno de cobertura negativo) foi preparado com células de MSC e submetidas ao mesmo processo aplicado nas células infectadas, com o objetivo de verificar a influência das proteínas celulares na especificidade do DB.

Produção do conjugado

As IgG foram obtidas por precipitação com sulfato de amônio (McKinney & Parkinson, 1987). Utilizou-se a cromatografia por afinidade em coluna de proteína A imobilizada em sefarose CL-4B pelo método do brometo cianogênico¹³ para purificação das IgG. A proteína total foi dosada (Lowry et al., 1951) e a IgG purificada foi liofilizada. O soro hiperimune, foi obtido por inoculação de coelhos jovens, segundo Hurn & Chantler, (1980), por via subcutânea, com 1,0 mg de IgG caprina emulsificada em adjuvante completo de

Freund. Após 30 dias, os animais receberam mais três aplicações de 1,0 mg de IgG emulsificada em adjuvante incompleto de Freund, intervaladas de 21 dias, quando se verificou a titulação dos soros por ELISA. Conjugou-se o soro hiperimune com peroxidase¹⁴ através do método do periodato (Nakane & Kawoi, 1974).

Dot-Blot (DB)

O DB foi desenvolvido e padronizado a partir da metodologia descrita por Stott (1989). A membrana de nitrocelulose (MN)¹⁵ foi cortada em pedaços de 11 x 7,5 cm, e disposta num aparelho de blot¹⁶ de 96 poços onde se colocou, em cada poço, 35µL de uma solução de PBS-T (PBS Tween-20 a 0,05%) e Ag com uma concentração de 0,5µg de proteína/poço. Cortou-se em tiras contendo cada uma dois poços sensibilizados com antígeno. Os sítios livres de ligação de proteínas por ventura presentes foram bloqueados pela adição do tampão (PBS com 2% de caseína) por 60 minutos. Lavou-se a MN duas vezes com PBS-T sob imersão durante dois minutos, cada. Colocaram-se as tiras de MN em tubos de ensaio contendo soro teste diluído em PBS-T (1:50) por 60 minutos. Lavou-se quatro vezes sob imersão durante dois minutos cada. Distribuiu-se o conjugado diluído 1:500 em PBS-T, por 90 minutos. Lavou-se a MN duas vezes com PBS-T e duas vezes com PBS, sob imersão durante dois minutos, cada. Revelou-se a MN numa solução de DAB/4-Chloronaphthol (*solução A*- 12 mg de Diaminobenzidine¹⁷ em 12mL de PBS, *solução B*- 5mg de 4-Chloronaphthol¹⁸ adicionado a 2 mL de metanol mais 10 mL de PBS. Misturou-se as duas soluções e acrescentou-se 10µL de H₂O₂ a 30%) por 15 minutos ao abrigo da luz. Quando ocorreu desenvolvimento muito intenso durante os primeiros minutos, a reação foi bloqueada usando água destilada. Todas as etapas, com exceção da revelação, foram realizadas sob agitação e a 37°C. Na leitura foram

¹⁴ Peroxidase - Sigma. Cat. N° P 8375

¹⁵ Membrana de nitrocelulose SIGMA Dura-blot™, com poro de 0,45µm. Cat. N° N 9641

¹⁶ Minifold™ SRC-96 Marca: Schleicher & Schuell, INC. Keene, N.H.

¹⁷ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) - Sigma. Cat. N° D 5637

¹⁸ 4-Chloro-1-Naphto - Sigma. Cat. N° C 8890

¹³ *Protein A sepharose* CL-4B - Pharmacia Biotech. Cat. N° 17-0780-01

considerados positivos todos aqueles soros que desenvolveram uma reação de cor, fraca ou forte, enquanto o soro negativo não desenvolveu cor.

ELISA Indireto (Elisa-i)

Conforme determinações da OIE/FAO (Wright et al., 1993) foram incluídos controles positivo, constituído de *pool* de soros fortemente positivos na IDGA, negativo, *pool* de soros comprovadamente negativos de rebanhos isento do problema, e de conjugado (somente tampão de incubação). Os soros foram testados em duplicata, sendo que os resultados expressos em densidade óptica (DO), foram transformados em percentagem do resultado médio de quatro repetições com o soro controle positivo, resultando numa escala de zero a 100. Resultados negativos e superiores a 100 foram considerados zero e 100%, respectivamente.

Foram utilizadas microplacas flexíveis, de polivinil, de 96 poços, de alta capacidade de adsorção¹⁹. A sensibilização foi realizada com 100µL contendo 0,5µg de antígeno em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) por 4 horas a 37°C ou 1 hora a 37°C e *overnight* sob refrigeração, em câmara úmida. Após a incubação lavou-se duas vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%, 0,05% de Tween 20). Bloqueou-se com tampão (PBS, 2% de caseína) e incubação a 37°C em câmara úmida, por 60 minutos, seguida de lavagem por duas vezes. Foram distribuídos na placa, 100µL dos soros teste, em duplicata, e dos soros padrões positivo e negativo (em quadruplicata), diluídos 1:50 em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20), onde permaneceram por 60 minutos à 37°C, em câmara úmida. Após a lavagem (seis vezes) distribuiu-se 100µL do conjugado anti-IgG caprina marcado com peroxidase na diluição ótima (1:1500) em tampão de incubação e manteve-se por 60 minutos à 37°C, em câmara úmida. Lavou-se novamente a placa por seis vezes e as reações foram reveladas pela adição de 100µL do substrato, uma solução de 0,2 mg/mL de σ -phenylenediamin (OPD)²⁰ e 0,02% (v/v) de H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 5,0), por 15 minutos à temperatura ambiente

¹⁹ Placas Microtest III – Falcon / USA. Cat. N° 3912

²⁰ σ -Phenylenediamine – OPD – Sigma. Cat. N° P 9029

ao abrigo da luz. A reação foi paralisada com 20 µL de H₂SO₄ (diluído 1:20). A intensidade da cor da reação foi determinada por absorbância em espectrofotômetro²¹ em 492 nm de comprimento de onda. Esta metodologia foi padronizada previamente (experimento 3 da tese).

IDGA

Foi utilizada a microtécnica de IDGA descrita por Gouveia (1994) realizada em ágar a 0,9% em tampão borato, utilizando 30 µl de soro/antígeno (Ag) comercial, derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus ovino contendo as proteínas: glicoproteína 135 (envoltório viral) e proteína estrutural p27(capsídeo), com a leitura realizada 48-72 horas após, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura.

Soro caprino

Na padronização do ponto de corte do ELISA-i foram selecionados 56 soros de caprinos de dois rebanhos sem raça definida, negativos para detecção de anticorpos para LVC pelo IDGA, oriundos da região tradicionalmente caracterizada pela criação extensiva. Para a comparação dos testes foram utilizados amostras do Banco de Soros do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária - UFMG (273 soros) e de duas fazendas do estado do Ceará (54 soros).

Validação do Dot-Blot

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos nos testes de IDGA, ELISA e DB. Foram avaliados sensibilidade relativa, especificidade relativa, valor preditivo positivo e negativo, e eficiência (habilidade do um teste identificar corretamente todos os indivíduos positivos e negativos). Os resultados dos testes foram comparados através do teste de qui-quadrado com correção de Yates (χ^2) (Tyler & Cullor, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos testes.

3.4.3- Resultados e discussão

O Ag produzido para o DB e ELISA-i apresentou uma concentração protéica de 2,21mg/mL. Testou-se este Ag na IDGA contra o soro padrão anti-MVV/CAEV e o mesmo

²¹ Espectrofotômetro Multiskan –MS, Labsystems

apresentou duas linhas de difícil visualização o que inviabilizou a utilização deste no IDGA.

A padronização do DB foi realizada através de uma série de simulações variando a quantidade de proteína de Ag por poço, o bloqueio, bem como as diluições de soro e do conjugado. A diluição do soro que apresentou melhores resultados foi de 1:50 e a menor quantidade de Ag que apresentou uma boa visualização foi de 0,5 µg de proteína (Figura 15). A padronização da diluição do conjugado utilizou as diluições de 1:300, 1:500, 1:700 e 1:1000 frente a quatro concentrações de antígeno/poço: 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25µg e 0,125µg, e foi observado que a diluição do conjugado de 1:500 apresentou melhor resultado com menos reações inespecíficas do soro negativo e foi, ainda, constatado que a concentração de 0,5 µg de antígeno apresentou boa visualização no soro positivo.

Na análise das soluções de bloqueio (PBS + leite em pó desnatado 3% – LPD, PBS + caseína 2% e PBS/Tween20 0,3%) com as MN sensibilizadas com 0,5µg de proteína, diluição do soro e conjugado de 1:50 e 1:500, respectivamente, verificou-se que todos as três apresentaram bons resultados, entretanto o que melhor as reações inespecíficas do soro negativo foi o bloqueio de caseína 2% (Figura 16).

Na Figura 17 consta o resultado da padronização do teste de DB. A MN sensibilizada com 0,5µg de proteína do antígeno foi bloqueada com uma solução de PBS/Caseína 2% e adicionados *pool* de soros positivos, fraco positivos e de soros negativos, testados pela MIDGA, numa diluição de 1:50. Após acrescentou-se conjugado coelho anti-cabra peroxidase, numa diluição de 1:500 e revelou-se com DAB/4-cloronathtol.

O ELISA-i foi padronizado no sentido de se obter diferença máxima entre as DO de soros negativos e positivos. Para determinação do ponto de corte utilizou-se a média da percentagem da DO de 56 soros de animais negativos pelo IDGA, oriundos de rebanhos seguramente isentos do LVC, mais três desvios padrões. De acordo com estes critérios chegou-se ao resultado de 11,72%. Estes 56 soros foram testados também pelo DB e apresentaram resultados negativos.

Como controle negativo verificaram as reações imunogênicas dos soros positivos e negativos (diluição de 1:50) frente a um controle celular não infectado. Todos os resultados do DB, utilizando soros positivos e negativos, foram negativos nas várias concentrações de proteína, de 0,016 µg a 2,0 µg, do cultivo de células de MSC, indicando que as proteínas das células da MSC não influenciaram os resultados.

Verificou-se que o ELISA-i detectou 209 caprinos positivos, o DB detectou 200, enquanto a IDGA detectou 144 animais (tabela 17). Vários autores encontraram resultados semelhantes com relação ao IDGA x ELISA-i no diagnóstico dos LVPR (Houwens et al., 1982; Schroeder et al., 1985; Simard et al., 1990; Heckert et al., 1992; Castro, 1998; Celer Jr et al., 1998).

Presumindo o ELISA-i como o teste referência, a comparação com o DB revelou concordância de 90,2% ($p < 0,001$) no teste de 327 amostras de soro caprino.

Diante destes resultados (Tabela 19) verifica-se que o DB é um teste com ótima sensibilidade e uma boa especificidade. A especificidade não apresentou resultados melhores aparentemente em decorrência de problemas na classificação dos verdadeiros negativos, pois considerando-se o grupo de animais nativos de fazendas tradicionais do Ceará estes foram negativos no DB, com 100% de concordância entre os testes. Segundo a classificação do índice Kappa (Thrusfield, 1995) o DB apresentou uma excelente concordância com o ELISA-i (Kappa $> 0,8$).

A eficiência de programas de controle dos LVPR depende da sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização em animais de um determinado rebanho e no manejo utilizado neste mesmo rebanho. Nos programas de controle ou erradicação, testes com maior sensibilidade e especificidade devem ser utilizados quando ocorrer uma redução substancial dos animais soropositivos, testados pelo teste de IDGA, e quando a taxa de soroconversão no rebanho, apesar de baixa, é mantida (Embrapa, 1996a).

O teste sorológico inicialmente utilizado no diagnóstico de LVPR (Crawford & Adams, 1981) e ainda largamente utilizado, é a IDGA

(Knowles, 1997). Este teste é o recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico sorológico de infecção por LVPR para comercialização internacional de pequenos ruminantes (OIE, 1996) e é utilizado em programas de controle e erradicação da infecção (Gouveia et al., 1994; Knowles, 1997). A IDGA apresenta reação antigênica cruzada entre isolados de LVC e LVO envolvendo todas as principais proteínas e glicoproteínas virais. Tanto os soros caprinos com anticorpos contra CAEV precipitam todas as proteínas do MVV, como os soros ovinos com anticorpos contra MVV precipitam as proteínas do CAEV (Gogolewski et al., 1985). Devido a esta reação cruzada e por estar mais disponível no mercado, em decorrência de uma maior produção (Cutlip et al., 1977), o antígeno aplicado neste trabalho foi produzido com LVO e contém as principais proteínas do gene *env* e *gag*, a glicoproteína gp135 e a core proteína p28, com os respectivos soros padrões, o que promove uma maior sensibilidade. Convém salientar, que se o antígeno fosse produzido com LVC a sensibilidade do teste seria provavelmente maior em até 35% devido ao uso de antígeno homólogo (Knowles et al., 1994).

A importância da escolha de um antígeno influencia marcadamente os resultados da IDGA no diagnóstico das enfermidades causadas pelos LVPR. A utilização de um antígeno com as duas proteínas (gp 135 e p28) aumentam a sensibilidade. Comparando pela IDGA dois antígenos da CAEV produzidos com as proteínas gp135 e p28. Adams & Gorham (1986) verificaram que o antígeno gp135 detectava um maior número de animais positivos que o antígeno p28, entretanto existiam animais que apresentavam somente anticorpos contra a p28. Com o objetivo de observarem como a expressão de anticorpos varia durante o tempo em caprinos soropositivos Hanson et al. (1996), utilizando a IDGA para detectar anticorpos para os antígenos gp135 e p28 do lentivírus MVV, verificaram que a expressão de anticorpos para CAEV variou ao longo do tempo, mostrando que reações soropositivas e soronegativas podem ocorrer intermitentemente. Baseado nestes fatos ressalta-se a necessidade da utilização conjunta das proteínas nos antígenos para aumentar a sensibilidade da prova.

Parte da validação de um novo teste sorológico deve incluir a sensibilidade e especificidade. O ideal seria realizar comparação dos resultados do novo teste com o verdadeiro *status* de infecção do animal, definido por algum sistema de teste biologicamente independente (não sorológico). Infelizmente o *status* de infecção do animal é raramente conhecido, especialmente na CAE em virtude da patogenia da enfermidade (Heckert et al., 1992). Knowles (1997) sugere a imunoprecipitação ou *immunoblotting* como referência para a comparação dos testes e critério independente e seguro de classificação da população de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Entretanto, no caso do *immunoblotting* pode ocorrer desnaturação de proteínas virais com alteração dos epitopos, principalmente nas glicoproteínas, durante a eletroforese (SDS-PAGE) verificada no LVC (Zanoni et al., 1989, Johnson et al., 1983) e/ou durante a transferência das proteínas do gel de poliácridamida para membrana de nitrocelulose (Johnson et al., 1983), o que reduz a sensibilidade deste teste. A imunoprecipitação é um teste muito caro, laborioso e quase impraticável para a realização de grande quantidade de testes. Em decorrência destes fatores utilizou-se, neste trabalho a sensibilidade e especificidade com base nos resultados dos próprios testes.

O antígeno produzido utilizou o vírus total e foi usado tanto para o ELISA como para o DB e a sua concentração foi compatível com a observada por Castro (1998). Zanoni et al. (1989) relataram que a utilização do vírus completo como fonte de proteínas antigênicas apresenta vantagens em reduzir resultados falso-positivos. Entretanto trabalhos com a junção de duas ou mais proteínas principalmente de regiões deferentes do vírus podem aumentar muito a sensibilidade do teste. Este antígeno quando testado no IDGA contra o soro padrão anti-MVV/CAEV² verificou-se a presença de duas linhas de difícil visualização o que inviabilizou a utilização deste na IDGA. Observação semelhante foi constatada por Abreu (1996) com o antígeno precipitado por PEG através de metodologia semelhante. Provavelmente durante a purificação as proteínas podem alterar a conformação necessária no teste de IDGA. Entretanto, Castro

(1998) verificou a presença de duas fortes linhas de precipitação.

Testou-se no ELISA os reagentes do *kit* comercial e verificou-se que o soro reagente do *Kit*, abundante em anticorpos contra a gp135, ficou abaixo do ponto de corte enquanto o soro positivo, rico em gp 135 e p 28 foi altamente positivo. Baseado nisto pode-se inferir que o ELISA-i, apesar de ser produzido com o vírus total provavelmente não possui quantidade de glicoproteína 135 suficiente para a sua detecção. O principal componente do antígeno deste ELISA é a proteína p28. Corroborando com este achado, Celer Jr. et al. (1998) verificaram, por *immunoblotting*, que a proteína gp135 só foi evidente em soros extremamente positivos e que o antígeno utilizado no ELISA produzido tinha como principal componente a p28.

Em virtude da similaridade antigênica entre os LVPR, explicada pela seqüência de nucleotídeos conservada da região *gag*, que codifica os determinantes antigênicos grupo-específico da p28 (Roberson et al., 1982), existem variações nucleotídicas que podem influenciar os resultados de testes sorológicos. A sensibilidade e a confiança dos testes sorológicos não dependem somente do tipo de teste utilizado, mas pode ser influenciado pelo método de preparação do antígeno utilizado no diagnóstico, na escolha da cepa viral, e dos componentes virais do antígeno mais relevantes imunologicamente (Celer Jr. et al., 1998). Na análise de dados de soroprevalência, além destes fatores, deve-se levar em conta que existem animais que mesmo infectados não podem ser diagnosticados sorologicamente em decorrência da soroconversão tardia, variação no títulos de anticorpos para LVPR durante a vida do animal (Hanson et al., 1996), heterogeneidade genética das cepas virais (Rosati et al., 1995) e latência sorológica (Perk, 1999).

O DB utilizando o vírus completo da amostra CAEV Cork foi superior ao teste IDGA e semelhante ao ELISA-i. O protocolo desenvolvido apresentou boa resolução e reação inespecífica baixa além de um bom rendimento; utilizou-se somente 0,5µg de antígeno e uma diluição de 1:500 de conjugado. Com relação a detecção direta do vírus o isolamento viral é caro, demorado e trabalhoso (Knowles, 1997), a hibridização *in situ* é de uso limitado (Brodie et

al., 1995) e em decorrência da alta mutabilidade dos LVPR, Pasick (1998) relata que a eficiência do teste de reação de cadeia de polimerase (PCR) esta intimamente dependente do *primer* e *template* utilizados, enquanto Wagter et al. (1998) relataram que a quantidade de amostra (sanguínea) pode influenciar a sensibilidade do PCR. Portanto o DB é um teste mais viável que a IDGA e o ELISA indireto para utilização no controle desta infecção, pois além de ser mais sensível que a IDGA, não necessita da indumentária tecnológica do ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e conseqüentemente mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões, etc) ou até mesmo no campo.

3.5 - PURIFICAÇÃO DE ANTÍGENO DO LENTIVÍRUS CAPRINO POR COLUNA DE AFINIDADE.

3.5.1 - Introdução

A artrite encefalite caprina viral é uma persistente, progressiva e debilitante enfermidade de caprinos causada por lentivírus, existindo várias cepas diferindo na virulência e antigenicidade (McGuire, 1990). Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) são vírus não oncogênicos constituídos pelos genes *gag*, *pol* e *env* e com três pequenas *open reading frames* (*tat*, *rev* e *vif*). Possuem envelope externo fosfolipídico composto pelos produtos do gene *env*, glicoproteínas de superfície e transmembrânica. A parte interna é formada pelos produtos dos genes *gag* e *pol*, as proteínas do capsídeo, do nucleocapsídeo e da matriz e pelas enzimas integrase, protease e transcriptase reversa, e por duas fitas de RNA idênticas e não complementares (Gonda, 1994; Murphy et al., 1995).

No processo de purificação das proteínas dos lentivírus para produção de antígenos ocorrem perdas principalmente das glicoproteínas por serem relativamente instáveis (Rimstad et al., 1994), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde podem haver perdas de até 50% destas proteínas virais (McGrath et al., 1978). Para minimizar estas perdas, e pela relativa simplicidade com que proporciona a separação, identificação e quantificação bioquímica, optou-se pela utilização de cromatografia em coluna de afinidade, que consiste em um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura obtida através da distribuição dos mesmos em duas fases, uma permanente estacionária, outra móvel, as quais estão em contato íntimo. Durante a passagem da fase móvel através da estacionária os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (Dean et al., 1985).

A cromatografia por afinidade ocupa lugar de destaque por proporcionar a purificação de biomoléculas fundamentado nas estruturas químicas ou nas propriedades biológicas

individuais das espécies que interagem. O princípio do método é instituído no isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, pelo uso das propriedades dessas substâncias de unirem-se reversivelmente a ligantes específicos. A técnica envolve a preparação da fase estacionária seletiva, por imobilização covalente de ligantes específicos à matriz ou suporte sólido. A amostra é aplicada à coluna contendo o ligante específico da amostra ligado ao suporte sólido. As moléculas que não possuem considerável afinidade pelo ligante passam pela coluna sem serem ligadas, enquanto que as macromoléculas capazes de unirem-se a este são retidas. A coluna ou matriz é equilibrada e eluída em tampão, sendo que nesta condição são praticamente eliminadas todas as substâncias que não foram ligadas por afinidade ao conjunto ligante-matriz, além daquelas que apresentam afinidade, mas excedem à capacidade de retenção da coluna. A eluição da substância do ligante é realizada por modificações de pH e/ou força iônica, ou ainda pela adição de uma substância que tenha maior afinidade pelo ligante (Dean et al., 1985; Collins et al., 1993).

Este trabalho teve como objetivo purificar as proteínas do CAEV através de coluna de bioafinidade.

3.5.2- Material e métodos

Soros utilizados na montagem da coluna de afinidade

No preparo da coluna de afinidade utilizou-se um *pool* de soros de caprinos de alguns estados brasileiros (CE, MG e RJ), positivos ao teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) frente a antígeno comercial²² derivado de culturas de células de membrana sinovial infectadas pelo lentivírus ovino contendo glicoproteína gp135 (envoltório viral) e proteína estrutural p27(capsídeo), e *pool* de lotes de soro reagente integrante do *kit* comercial¹, com anticorpos anti-gp135, totalizando 71 mL com a seguinte proporção de mistura:

<i>Pool</i> de	9 mL de soro reagente do <i>kit</i> comercial.
soros	27 mL de soro caprino positivo do
utilizados	Ceará
na	
coluna	45 mL de soro caprino positivo do
	Banco de Soro da UFMG (MG e RJ).

Precipitação da IgG

A precipitação da IgG foi obtida pela adição, por gotejamento, da mesma quantidade (71 mL) de solução saturada de sulfato de amônio, sob agitação constante e refrigeração (banho de gelo). Após agitação, *overnight*, à 4°C, centrifugou-se por 45 minutos a 3000 rpm (2100g) e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 50 mL de PBS (0,05M; 0,15M NaCl; pH 7,4) e dialisado²³ em PBS diluído 10 vezes por 48 horas com seis trocas do PBS. Na última troca da diálise, *overnight*, utilizou-se PBS não diluído.

Purificação da IgG

A coluna foi preparada tendo como fase estacionária, proteína A imobilizada em sefarose CL-4B pelo método do brometo cianogênico²⁴. A solução com IgG precipitada foi fracionada em volumes iguais (13 mL), e na passagem de cada fração realizou-se o seguinte protocolo: lavou-se a coluna com PBS por 60 minutos, acompanhando com leituras no espectrofotômetro (comprimento de onda de 280 nm) até zerar a densidade ótica (DO) do filtrado; aplicou-se a fração (13 mL) e por duas vezes reciclou-se o material coletado com um fluxo de aproximadamente 20 mL/hora; lavou-se a coluna com PBS até a densidade ótica do filtrado (comprimento de onda de 280 nm) ser semelhante a DO do PBS; aplicou-se glicina-HCl (0,1M; pH 2,8; 0,15 M de NaCl) e colheu-se o pico em frascos separados com aproximadamente 4 mL. Com o objetivo de retirar a glicina e elevar o pH para próximo a neutralidade, dialisou-se *overnight* o pico da glicina contra PBS diluído 10X. Repetiu-se este protocolo com as outras quatro frações. Dosou-se a proteína total (Lowry et al, 1951) antes (13,98 mg/mL) e após (0,46 mg/mL) a purificação da IgG. Determinou-se o perfil eletroforético da IgG antes e após a purificação, onde verificou-se a proteína purificada com um peso molecular aproximado de 200 kDa. Em seguida, liofilizou-se a solução final (aproximadamente 67 mL).

Montagem da coluna de afinidade IgG caprina

Foram utilizados 13,3 mL de IgG purificada com 2,29mg/mL totalizando 30,23 mg de proteína e 1g de sefarose CL-4B ativado com brometo cianogênico²⁵. O pó seco (1g de sefarose 4B) foi inchado em 200 mL de HCl 1mM, divididos em 5 porções. Colocou-se 40 mL de volume de HCl 1 mM num tubo Falcon e centrifugou-se a 3000 RPM (2100g) por 5 minutos à 4°C. Retirou-se o sobrenadante mantendo-se sempre um pouco de HCl para evitar que o gel fosse retirado. Foi completado os 40 mL com mais HCl 1mM e centrifugou-se novamente. O processo foi repetido por cinco vezes. Foram realizadas mais duas lavagens (centrifugação a 3000 RPM (2100g) por 5 minutos à 4°C) com tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1M, pH 8,3 com 0,5M NaCl). Deixou-se uma pequena quantidade de tampão e rapidamente adicionou-se o ligante (30,23 mg de IgG purificada de soros positivos). Agitou-se lentamente, por inversão, durante 2 horas à temperatura ambiente e *overnight* a 4°C, centrifugou-se (2100 g por 5 minutos à 4°C) recolhendo-se o sobrenadante para dosagem de proteína. Bloqueou-se os grupos que permaneciam ativos com glicina (0,2 M, pH 8,0 com 0,5 M de NaCl), sob agitação por inversão. Centrifugou-se, novamente, e retirou-se o sobrenadante com glicina. Lavou-se o gel elevando (tampão carbonato 0,1M pH 8,3 com 0,5 M de NaCl) e baixando (tampão acetato 0,1M pH 4,0 com 0,5M de NaCl) alternadamente o pH (cinco vezes cada). Por final lavou-se duas vezes com 20 mL de PBS e colocaram-se aproximadamente 25 mL de PBS e 100µL de azida sódica e guardou-se a coluna em refrigeração (2-8°C).

Purificação do antígeno

A coluna de afinidade foi testada com a purificação do antígeno lote 1 (AgL1) obtido por concentração do sobrenadante de subcultivos (nona passagem) de células de membrana sinovial caprina (MSC) infectadas com 200 doses formadoras de sincício (DFS/mL) do lentivírus caprino (LVC) padrão (amostra americana CAEV-Cork com título 10^{5,3} TCID₅₀/mL) concentrado 50 vezes pelo

²³ Membrana de diálise com *cut-off* de 10 kDa Dialysing tubing 3787-D10 Thomas Scientific, USA.

²⁴ Protein A sepharose CL-4B - Pharmacia Biotech. Cat. N° 17-0780-01

²⁵ Sepharose 4B ativada por brometo cianogênico - Sigma. Cat. N° C 9142

sistema de ultrafiltração AMICON²⁶, e testado na MIDGA conforme descrito por Gouveia (1994).

A coluna inicialmente foi lavada com PBS por centrifugação (2100g por 5 min. a 4°C) por duas vezes. Diluiu-se 2,5 mL do AgL1 em 2,5 mL de PBS e colocou-se na coluna sob agitação, durante 120 minutos a temperatura ambiente e depois sob refrigeração *overnight*. Lavou-se bem a coluna com PBS e verificou-se pela DO (280 nm) até zerar. Passou-se glicina (0,1M; pH 2,8 com 0,15 M de NaCl), para liberar as proteínas ligadas as IgG, e colheu-se 12 tubos cada um com aproximadamente 4 mL. Lavou-se a coluna, deixando passar aproximadamente 100 mL de PBS. Foi feita a leitura da DO (280 nm) dos tubos e coletou-se o pico.

Eletroforese (SDS-PAGE) e Immunoblotting

O antígeno comercial, AgL1 e o antígeno purificado pela coluna de afinidade (AgL1CA) foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *immunoblotting*. O perfil eletroforético foi determinado nas amostras de antígeno diluídas em tampão de amostra (SDS 10%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2%; 0,5M Tris-HCl, pH 6,8) aquecendo a mistura a 100°C por 3 minutos, seguido pela SDS-PAGE utilizando mini-gel²⁷ com 10% de gel de separação e 4% de gel de concentração, acompanhando com padrão *broad-range* (10 – 200 kDa)²⁸ (Laemmli, 1970). As proteínas do gel foram coradas usando azul de Comassie segundo Harlon & Lane (1988).

No *immunoblotting* as proteínas do antígeno inicialmente foram separadas por SDS-PAGE conforme protocolo relatado anteriormente e transferidas do gel para membrana de nitrocelulose²⁹ (MN) através do trans-blot³⁰ por 60 minutos a 100 volts e 350 mA (Towbin et al., 1979). Após a transferência para MN as proteínas foram bloqueadas com solução de bloqueio (PBS Tween 0,3%) por 60 minutos e lavadas com solução de lavagem (PBS Tween

0,05%) por três vezes, cinco minutos cada. O soro positivo do *kit* comercial foi diluído (1:50) e aplicado por 90 minutos. Após o processo de lavagem citado anteriormente foi colocado conjugado coelho anti-cabra peroxidase diluído (1:1500) em PBS, por 60 minutos. A MN foi novamente lavada com PBS Tween 0,05% por três vezes, cinco minutos, cada e com PBS, duas vezes, cinco minutos cada. Revelou-se a MN numa solução de DAB/4-Chloronaphthol (*solução A*- 12 mg de Diaminobenzidine³¹ em 12mL de PBS, *solução B*- 5mg de 4-Chloronaphthol³² adicionado a 2 mL de metanol mais 10 mL de PBS. Misturou-se as duas soluções e acrescentou 10µL de H₂O₂ a 30%) por 10 a 15 minutos ao abrigo da luz. Todas as etapas, com exceção da revelação, foram realizadas sob agitação. No final, a MN foi lavada com água destilada e secada em papel de filtro.

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Foi realizado um ensaio de ELISA com o antígeno purificado pela coluna de afinidade. Microplaca flexível Falcon® de 96 poços foi sensibilizada *overnight* com 200ng/poço de proteína purificada. Os sítios livres de ligação de proteínas por ventura presentes foram bloqueados pela adição do tampão (PBS, 2% de caseína) e incubação a 37°C em câmara úmida, por 60 minutos, seguida de lavagem por duas vezes. Foram distribuídos, 100µL do soro teste (soro positivo do *kit* comercial) em diluição seriada em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20), e incubou-se a placa por 60 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após a lavagem (seis vezes) distribuíram-se 100µL do conjugado (IgG de coelho anti-IgG caprina marcado com peroxidase) na diluição ótima (1:1500) em tampão de incubação e manteve-se por 60 minutos à 37°C, em câmara úmida. Lavou-se novamente a placa por seis vezes e as reações foram reveladas pela adição de 100µL do substrato, uma solução de 0,2 mg/mL de σ -phenylenediamine³³ (OPD) e 0,02% de H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 5,0), por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da

²⁶ Ultrafilters com membrana de *cut-off* de 10Kda – AMICON MILLIPORE

²⁷ Mini-Protean II Cell® - Bio-Rad

²⁸ Broad-range 10-200kDa Protein Ladder – Gibco. Cat. N° 10064-012

²⁹ Membrana de nitrocelulose Dura-blot[™], com poro de 0,45µm – Sigma. Cat. N° N 9641

³⁰ Trans-blot ® - Bio-Rad

³¹ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) – Sigma. Cat. N° D 5637

³² 4-Chloro-1-Naphto – Sigma. Cat. N° C 8890

³³ σ -Phenylenediamine – OPD – Sigma. Cat. N° P 9029

luz. A reação foi inibida por adição de 20 µL de H₂SO₄ (diluído 1:20). A intensidade da cor da reação foi determinada por absorvância em espectrofotômetro³⁴ em 492nm de comprimento de onda.

3.5.3- Resultados e discussão

Na montagem da coluna foram utilizados soropositivos tanto de origem ovina (soro positivo comercial), como soropositivos de caprinos de regiões diferentes: Nordeste (Ceará) e Sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro). Com isto, aumentou a diversidade de anticorpos da coluna de afinidade frente aos LVPR. A quantidade de IgG ligada na coluna foi de 20,48 mg (67,75% de ligação), calculada pelo total de IgG inicial (30,23 mg) subtraindo-se a que se encontrava no sobrenadante (9,75 mg).

Na MIDGA do AgL1 observou-se linha nítida de precipitação na presença de *pool* de soro positivo pelo MIDGA e soro positivo do *kit* comercial (Figura 18). O mesmo antígeno concentrado 150 vezes foi testado frente ao soro positivo do *kit* comercial, onde pode-se verificar a presença de duas linhas de precipitação referentes às proteínas p28 e a gp135 (Figura 19).

Após a passagem do AgL1 pela coluna coletou-se um primeiro pico (figura 20). O processo foi repetido novamente com o material que sobrou da primeira passagem (pico 2) e os picos colhidos, que totalizaram aproximadamente 15 mL, foram dialisados contra água milli-Q com três trocas de duas em duas horas e a última *overnight*. Após a diálise restaram aproximadamente 14 mL que foram liofilizados e resuspenso em 1 mL, sendo dosada a proteína total (Lowry, 1951) que apresentou 430µg/mL.

Na eletroforese SDS-PAGE e *immunoblotting* foram utilizadas as seguintes quantidades de proteína de antígeno:

Canaleta	Volume	Quantidade de proteína aplicada
1 Padrão	5,0 µL	10,3 µg
2 Ag <i>Kit</i>	8,0 µL	12,2 µg
3 Ag L ₁	5,0 µL	11,4 µg
4 Ag L ₁ CA	25,0 µL	10,0 µg

No *immunoblotting* utilizaram-se as mesmas quantidades acrescidas do controle negativo (10,0 µg de proteína/canaleta).

Na eletroforese verificou-se que no antígeno comercial (AgK) e no antígeno concentrado lote 1 (AgL₁), a banda mais visível foi a de peso molecular (PM) aproximado de 67kDa correspondente a albumina oriunda, provavelmente, do soro fetal bovino utilizado no meio de cultura. No AgL₁CA verificou-se quatro proteínas purificadas de PM aproximados: 80kDa, 70kDa, 55kDa e 27kDa (Figura 21).

No *immunoblotting* verificou-se que todos os Ags apresentaram uma banda de aproximadamente 27 kDa sendo que no AgL₁CA ela foi mais intensa (figura 21). No AgL₁CA e AgL₁ constatou-se outra banda de PM aproximado de 48 kDa, entretanto sendo bem mais forte no AgL₁CA. Segundo Kwang & Cutip (1992) a glicoproteína transmembrânica (gp44) e a proteína do capsídeo (p27) são os principais determinantes antigênicos dos lentivírus ovinos, o que corrobora com os achados neste trabalho. No AgL₁ observou-se também uma banda com 70 kDa. É interessante destacar que foi verificada a presença da glicoproteína com PM variando de 140 a 145 kDa em todos os antígenos. Nos AgL₁ e AgL₁CA verificou-se, ainda, uma banda de PM de 19kDa. Comparando as bandas observadas por SDS-PAGE com as por *immunoblotting*, pode-se verificar que nos AgKit e AgL1 somente a p28 apareceu nitidamente, no AgCA das quatro proteínas da eletroforese somente a proteína p28 imunoreagiu.

Torfason et al. (1992) numa revisão sobre polipeptídios em lentivírus ovino relataram que muitos trabalhos tem sido realizados para determinar o número de polipeptídios, nomenclatura em termos de peso molecular e glicosilação dos polipeptídios. Salientam, ainda,

³⁴ Espectrofotômetro Multiskan -MS, Labsystems.

que o número de polipeptídios reportados para o vírus Maedi-Visna maduro varia de 10 a 25. Neste trabalho descreve-se que os três *gag* polipeptídios dos lentivírus ovinos são p14, p16 (que pode ser designado como p15 ou p16), e a principal proteína nuclear p25 (designada como p25, p26, p27, p28 e p30). A banda de 35kDa é um precursor (Pr35), que de acordo com Sonigo et al. (1985) pode ser a gp39. A existência da gp44 (reportada como 44kD, 45kD ou 46kD) é bem documentada (Haase & Baringer, 1974; Cheevers & McGuire, 1988). Tem sido relatadas a p50 ou gp51, tanto quanto o precursor Pr55^{gag}. A 70kDa tem sido reportado uma glicoproteína (gp70) como também um monômero da transcriptase reversa. A p80 e a gp90 (reportada como gp92) foram descritas (Hase & Baringer, 1974; Cheevers et al., 1988a). Um polipeptídeo fosforilado (gp90) pode possivelmente ser parte da transcriptase reversa. Relatam-se, também, a gp105 e a gp135 (descrita como gp115, gp140 ou gp145). Finalmente existem os precursores: Pr150^{gag-pol} (ou Pr175^{gag-pol}) e o gPr150^{gag-pol} (ou gPr175^{gag-pol}). Com o lentivírus caprino (LVC) os relatos são semelhantes. A tabela 1 apresenta as proteínas e glicoproteínas e seus precursores identificados por imunoprecipitação ou *immunoblotting* neste e em outros trabalhos realizados com o lentivírus caprino.

As proteínas do LVC (CAEV Cork) encontradas neste trabalho, na SDS-PAGE e *immunoblotting*, foram relatadas na literatura, com exceção da de 80kDa, a qual pode ser oriunda de uma desnaturação da gp135 ocorrida na SDS-PAGE na qual existe uma desnaturação diferencial do antígeno principalmente com as proteínas de alto peso molecular (Johnson et al., 1983). Torfason et al. (1992) relatam que alguns antígenos, especialmente as glicoproteínas, são sensíveis ao tratamento sofrido na purificação. Relatam, também, que no início dos testes *immunoblotting* e ELISA comerciais para o diagnóstico do lentivírus humano (HIV) os glicopolipeptídeos eram pobremente expressados, provavelmente devido a perda destes durante a preparação. Ozyoruk et al. (2001) verificaram no *immunoblotting* que anticorpos monoclonais reagiram com glicoproteína de superfície do vírus CAEV-63 seguidos de desnaturação somente na ausência de agente redutor, indicando que as pontes

disulfeto intramolecular foram essenciais para a integridade do epitopo.

Três das quatro proteínas componentes do AgL₁CA verificadas através do *immunoblotting* - glicoproteína de superfície (gp145), glicoproteína transmembrânica (gp48) e proteína do capsídeo (p27) - são consideradas como as que apresentam melhor antigenicidade, sendo sistematicamente utilizadas nos testes sorológicos para detecção de anticorpos contra os LVPR, seja no IDGA (Adams et al., 1985; Adams & Gorham, 1986; Knowles et al., 1994), como, também, no ELISA (Schroeder et al., 1985; Heckert, et al., 1992; Kwang & Cutlip, 1992; Rosati et al., 1995). Portanto, o uso da cromatografia de bioafinidade é uma alternativa viável, principalmente quando necessita-se de antígeno altamente purificado.

Recentemente, a cromatografia de afinidade (CA) vem sendo utilizadas no estudo dos LVPR. Berger et al. (2001) estudando a função de integrase no CAEV, MVV e HIV-1 produziram proteínas quimeras a integrase, expressados em *Escherichia coli*, purificadas em CA, enquanto Ozyoruk et al. (2001) construiu uma CA com anticorpos monoclonais e purificou a glicoproteína de superfície (gp135) do CAEV cepa 63 para verificar o potencial de aplicação de quatro diferentes anticorpos monoclonais para o uso em ensaios imunoenzimáticos.

No ELISA indireto utilizando o AgL₁CA observou-se que a diluição do soro de 1:200 e 200ng de antígeno apresentou uma diferença, entre as DO do *pool* de soros positivos e negativos, de aproximadamente 0,5. QUE viabiliza o desenvolvimento deste teste. Diante dos resultados verificou-se que o uso da cromatografia de afinidade é uma alternativa viável, principalmente quando necessita-se de antígeno altamente purificado.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos anos 70, importações de caprinos de raças leiteiras exóticas, procedentes de distintos países da Europa e América do Norte buscaram a introdução de potencial genético leiteiro em animais puros ou de seus cruzamentos com mestiços de raças nativas brasileiras (Assis, 1994). Esta atividade vem se desenvolvendo rapidamente tornando-se cada vez mais importante na geração de recursos nacionais. Segundo Silva (1996), o Brasil conta com uma produção de leite de cabra de aproximadamente 4,5 mil toneladas/ano destacando-se a região Sudeste como maior produtora (65%) seguida pelas Regiões Nordeste (26%), Centro-Oeste (6%) e Sul (3%). Com a importação destes animais de raça leiteira, sem adequados critérios sanitários, ocorreu a efetiva introdução de agentes infecciosos no Brasil com conseqüente dispersão de doenças infecciosas entre os rebanhos e elevação dos gastos com medicamentos e adoção de medidas terapêuticas e de controle (Assis, 1994).

Considerando-se a realidade sócio-econômica e o tipo de exploração zootécnica predominante no Nordeste brasileiro, a presença do LVPR nos animais leiteiros representa grande risco de disseminação do agente para os rebanhos SRD e nativo. Com o levantamento da CAE no estado do Ceará pode-se constatar que os rebanhos nativo/SRD estão praticamente isentos do problema e mesmo em regiões de produção leiteira no interior do estado (região metropolitana de Sobral e Quixadá) apresentam baixo índice da infecção, sendo o principal problema a região metropolitana de Fortaleza, onde localiza-se o maior número de rebanhos leiteiros do estado.

A ocorrência da CAE no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (CNPIC) - EMBRAPA, em graus diversos, motivou a elaboração e implantação, a partir de 1994, com o apoio de DMVP-EV-UFGM, do programa de controle da CAEV (PCAEV), onde os diversos campos experimentais com características epidemiológicas distintas (variando de negativo a com alta prevalência de CAE) e com movimentação de animais entre si, que refletem a situação encontrada nos planteis nacionais onde ocorre a movimentação freqüente de

animais entre propriedades positivas e negativas. O objetivo do PCAEV foi controlar no rebanho caprino e monitorar no rebanho ovino as lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR) através da eliminação da doença clínica, redução do número de animais infectados, obtenção de animais soronegativos para reposição do plantel e controle da infecção do plantel, através de rigorosa vigilância epidemiológica. As medidas de controle basearam-se no bloqueio da transmissão do vírus a partir de animais infectados considerando as principais vias de infecção (colostro, leite e sangue periférico) e que a transmissão horizontal também pode ocorrer. Procurou-se, inicialmente, minimizar o contato entre animais adultos soropositivos e soronegativos, que foram separados, uma vez que o vírus é pouco resistente no meio ambiente. Na primeira fase o monitoramento sorológico semestral, através do IDGA, associado a medidas de controle buscou possibilitar a obtenção de animais soronegativos e com desenvolvimento ponderal adequado para gradativa reposição do plantel base (EMBRAPA, 1994). Numa segunda fase o monitoramento sorológico foi alterado de acordo com o comprometimento dos rebanhos, variando de 4 a 12 meses o intervalo entre coletas. No levantamento inicial verificou-se uma prevalência média no rebanho caprino de 14,3%. Com a implantação das medidas de controle verificou-se na segunda sorologia uma taxa de 4,9%, na terceira 4,4%, na quarta 2,7% e na quinta 1,4%, sendo os novos casos descartados. Diante deste resultado constatou-se que as medidas sanitárias surtiram bom efeito, entretanto apesar da redução gradual, verificou-se uma tendência de estabilização das taxas em patamares baixos indicando a presença de falsos-negativos que o IDGA não consegue detectar (EMBRAPA, 1996a). A IDGA não é muito sensível e gasta-se muito tempo para sua realização, principalmente em grandes quantidades de amostras (Schroeder et al., 1985). A detecção de animais com anticorpos contra LVPR pela IDGA no CNPIC vem sendo realizada semestralmente até o presente momento com manutenção de 0,5% a 2% de animais positivos (dados não publicados). Com a aplicação futura das técnicas desenvolvidas neste trabalho (ELISA e *Dot-Blot*), as quais apresentam sensibilidade relativa bem maior que a IDGA, com repetição semestral e

realização de *immunoblotting* ou PCR nos resultados inconclusos, é bem possível que num prazo médio tenha-se negativado o rebanho. A permanência dos resultados negativos de todos o plantel ovino e caprino é necessária em quatro testes consecutivos, para considerá-lo livre dos LVPR.

O controle das LVPR, mesmo num rebanho fechado e controlado, é um trabalho laborioso e muito lento, sendo em alguns momentos frustrantes diante dos resultados. Muitas vezes a implantação da separação das crias a zero hora ou obtidos por cesariana, separação imediata e sacrifício de todos os animais positivos, utilização de testes mais sensíveis como o ELISA, não conseguem eliminar rapidamente a enfermidade do rebanho. Isto ocorre em decorrência de uma série de fatores, uma vez que todos os testes de diagnóstico para os LVPR possuem limitações. Um status sorológico negativo não é garantia de rebanho livre da infecção. Muitos fatores como soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica, replicação restrita, manejo do rebanho e limitações na disponibilidade do teste detectar animais infectados tornam difícil o controle e a erradicação dos LVPR. Embora os programas de controle possam ser difíceis de implementar, o impacto econômico é amortizado quando a prevalência da infecção é baixa, portanto a implementação do simples método de privação do colostro já reduz significativamente as perdas econômicas. Embora o Brasil não disponha de programas sanitários oficiais de controle dos LVPR certas recomendações citadas são importantes e úteis para o controle ou diminuição da velocidade de propagação e controle da doença nos rebanhos nacionais.

Em rebanhos com alta prevalência não se justifica, eliminar, sumariamente, os animais clinicamente afetados, uma vez que existe, geralmente um grande número de portadores são nos rebanhos infectados. Os animais afetados devem ser separados e receber o manejo com boas condições de higiene e nutrição, com o fim de evitar o aumento da incidência de lesões e obtenção do maior número possíveis de crias negativas para LVPR com a preservação do material genético.

A detecção de infecção por LVPR através de PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da

seqüência alvo, da quantidade da amostra e da especificidade do *primer* (Knowles, 1997; Wagner et al., 1998). Entretanto, esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando estiver disponível rotineiramente, para identificar os animais não diagnosticados através da sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que esta técnica seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (Knowles, 1997).

A aquisição ou troca de reprodutores com o objetivo de melhoria dos plantéis caprinos, são práticas rotineiras utilizadas pela maioria dos criadores. Por outro lado, a evidência sorológica da presença do LVC em reprodutores caprinos, associada à recente detecção do vírus no sêmen de caprinos infectados, permitem inferir que a dispersão do agente entre plantéis através da introdução de reprodutores soropositivos ou de sêmen congelado deve ser considerada quando do estabelecimento de programas de controle da CAE em caprinos. Segundo Pinheiro (1999), atualmente o LVC se encontra disseminado nos reprodutores nas principais regiões produtoras de leite de cabra do Ceará. Em virtude da disseminação do CAEV no Ceará e no país, associações, criadores e órgãos oficiais devem buscar rapidez e qualidade nas informações, que possibilitem uma vigilância epidemiológica efetiva, adoção de medidas profiláticas adequadas e maior controle no trânsito, comercialização e importação de animais, sêmen e embriões. O delineamento de um programa de controle da CAE no Nordeste foi desenvolvido por técnicos do CNPC juntamente com professores da UFMG, UECE, UFRPE, UFBA (EMBRAPA, 1996b). Para implementá-lo necessita-se de articulação de todos os componentes do sistema de produção caprina: produtores, técnicos extensionistas, veterinários autônomos, professores e pesquisadores e das entidades de classe como as associações de criadores, além do Ministério da Agricultura, Secretaria de Agricultura dos estados e empresas de extensão rural (EMATER) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

Em virtude da variabilidade antigênica e genômica dos LVPR seria interessante a utilização de um *pool* de amostras brasileiras para a produção de antígeno. Entretanto, é interessante salientar que muitas amostras de

campo são muito líticas com pouca produção viral e consequentemente pouca produção de sobrenadante para a produção de antígeno, o que inviabilizaria a obtenção de antígeno em grande escala. A utilização de antígenos mais purificados como por coluna de afinidade usando soros de animais positivos brasileiros, onde selecionaria as proteínas virais mais imunoreagentes, seria uma alternativa de aumentar significativamente a sensibilidade dos testes de diagnóstico.

A maior rapidez e sensibilidade do *Dot-Blot* aliado à simplicidade na realização, não necessitando de aporte laboratorial, comparado aos outros testes de diagnóstico, IDGA e ELISA, facilita a implantação deste como teste de escolha pelos órgãos oficiais para ser realizado tanto rotineiramente como para ser utilizado em eventos onde existe grandes chances de difusão do agente, tais como: feiras, exposições, concursos leiteiros, locais de troca de animais, etc. Além disto, este teste poderia se tornar obrigatório pelos fomentadores de recursos (Bancos, Cooperativas, etc.) para a aquisição de animais. Tudo isto aliado ao principal fator que deve ser a conscientização dos criadores sobre esta enfermidade e os prejuízos por ela causados.

4.1 - Custo de produção dos testes (MIDGA, ELISA e *Dot-Blot*)

Na estimativa do custo de produção procurou-se abranger todos os gastos utilizados na cadeia produtiva dos testes MIDGA, ELISA-i e *Dot-Blot* (Anexo3). Foram considerados os custos desde a produção das células utilizadas no cultivo primário até a realização final do teste. Foram incluídos nos cálculos os valores referentes aos custos diretos fixos e variáveis e custos indiretos fixos e variáveis. Os valores estimados para os testes foram: US\$ 0.67; US\$ 1.00 e US\$ 1.22 para o IDGA, *Dot Blot* e ELISA indireto, respectivamente. No caso do MIDGA o cálculo baseou-se na produção de 112 testes referentes a 1 mL de antígeno utilizando de 35µL por poço para o diagnóstico de quatro amostras. No *Dot Blot* e no Elisa baseou-se na utilização do aparato para o *blot* de 96 poços e na placa de 96 poços, respectivamente. Nestes dois testes as amostras foram realizadas em duplicatas para maior segurança. Com base nestes resultados verificou-se que o *Dot-Blot* além de ter

sensibilidade semelhante ao ELISA e praticamente não necessitar de aparato laboratorial é 22% mais barato. Comparando com o MIDGA, apesar de ser mais caro é muito mais rápido e sensível.

4.2 - Perspectivas de trabalhos com os dados e/ou resultados da tese

- Medidas das circunferências carpo-metacarpianas em caprinos;
- Classificação dos criatórios caprinos do Ceará segundo sua infraestrutura e manejo;
- Comparação das fazendas com e sem a presença do CAEV;
- Aspectos produtivos e reprodutivos do rebanho caprino cearense;
- Manejo alimentar dos criatórios caprino no Ceará;
- Correlação entre peso x perímetro torácico de caprinos;
- Estabilidade do Ag-IDGA – Amicon (tempo x temperatura – temp. ambiente, 4°C, -20°C e -80°C);
- Variação das concentrações de tempo para coleta e de soro fetal bovino no sobrenadante para produção de antígeno utilizados em ensaios imunoenzimáticos;
- Estudo prospectivo através da curva sorológica de vários testes (IDGA, ELISA, *Dot-Blot* e PCR) em rebanho com presença do CAEV;
- Validação do *Dot-Blot* no programa de controle atualmente implantado na Embrapa Caprinos e em criatórios particulares;
- Utilização de um sistema de amplificação tipo peroxidase x anti-peroxidase ou biotina-avidina no *Dot-Blot*;
- Comparação do antígeno purificado com coluna de afinidade e antígeno preparado em colchão de sacarose em ensaios imunoenzimáticos.

5. CONCLUSÕES

- 1- O vírus da artrite encefalite caprina não encontra-se disseminado nos rebanhos SRD/Nativo do Ceará;
- 2- O CAEV já se encontra presente em várias regiões do Ceará;
- 3- A dispersão do agente entre plantéis através da introdução de reprodutores caprinos soropositivos (aquisição, troca ou empréstimo) deve ser considerada;
- 4- O manejo sanitário dos caprinos destes criatórios é precário, independente do tipo de exploração ou regime de criação, com mortalidade de animais considerada alta, principalmente de jovens, comprometendo o desenvolvimento da atividade;
- 5- Problemas como artrite, helmintose, linfadenite, mamite e pneumonia acometem mais rebanhos criados sob regime semi-intensivo/intensivo;
- 6- O ELISA-i desenvolvido mostrou-se um teste mais sensível que a IDGA podendo ser indicado para utilização no controle dos LVPR;
- 7- O teste *Dot-Blot* utilizando o antígeno com o vírus completo da amostra CAEV Cork apresenta sensibilidade semelhante ao ELISA indireto na detecção de anticorpos contra os LVPR, e pela rapidez, facilidade de execução, eficiência e pouco custo, é um teste de eleição para ser empregado em locais de grande movimento e comércio de animais tais como: exposições, feiras, concursos, etc.;
- 8- O uso da cromatografia de afinidade é uma alternativa viável para produção de antígeno purificado de LVPR.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, F.T. *Isolamento de um vírus sincicial caprino (amostra RPE-03) e comparação da sensibilidade e especificidade relativas do antígeno Maedi-Visna frente ao antígeno AEC (amostra Cork) em teste de IDGA*. Recife, PE: UFRPE - Departamento de Medicina Veterinária. 1996, 45p. Dissertação (Mestrado).
- ADAIR, B.M. Serological surveillance for Maedi-Visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus in Northern Ireland. *Vet. Rec.*, v. 118, p. 422-423, 1986.
- ADAMS, D.S., CRAWFORD, T.B. CAE: a viral arthritis-encephalitis syndrome in goats. *Inter. Goat Sheep Res.*, v. 1, n. 2, p. 168-172, 1980.
- ADAMS, D.S., CRAWFORD, T.B., ANDERSON, P. K. A pathogenic study of the early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. *Am. J. Pathol.*, v. 99, n. 2, p. 257-279, 1980b.
- ADAMS, D.S., CRAWFORD, T.B., BANKS, K.L., McGUIRE, T. C., PERRYMAN, L. E. Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect. Immun.*, v. 28, n. 2, p. 421-427, 1980a.
- ADAMS, D.S., GOGOLEWSKI, R.P., BARBET, A. F., CHEEVERS, W.P. Identification of caprine arthritis-encephalitis retrovirus proteins in immunodiffusion precipitin lines. *J. Gen. Virol.*, v. 66, n. 5, p. 1139-1143, 1985.
- ADAMS, D.S., GORHAM, J.R. The gp135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, v. 40, n. 2, p. 157-160, 1986.
- ADAMS, D. S., KLEVJER-ANDERSON, P., CARLSON, J.L., McGUIRE, T.C., GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, n. 9, p.1670-1675, 1983.
- ADAMS, D.S., OLIVER, R.E., AMEGHINO, E., DeMARTIM, J.C., VERWOERD, D.W., HOUWERS, D.J., WAGHELA, S., GORHAM, J.R., HYLLSETH, B., DAWSON, M., TRIGO, F.J., McGITIRE, T.C. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Rec.*, v. 115, p. 493-495, 1984.
- ADEYEMO, O., GAO, R.J., LAN, H.C. Cytokine production in vitro by macrophages of goats with caprine arthritis-encephalitis. *Cell Mol. Biol.*, v. 43, n 7, p. 1031-1037, 1997.
- AFSHAR, A., DULAC, G.C., RIVA, J. Comparison of blocking dot ELISA and competitive ELISA, using a monoclonal antibody for detection of bluetongue virus antibodies in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 31, n. 1, p. 33-39, 1992.
- AGRIMI, P., LEGROTTAGLIE, R., TOLARI, F. Visna maedi virus. I. Seroepidemiological studies in sheep and goat flocks on Tuscany. II. Serum antibodies in imported sheep and goats. *Atti Soc. Italian Sci. Vet.*, v. 38, p. 720-725, 1984.
- AL-ANI, F. K., VESTWEBER, J. G. E. Caprine arthritis-encephalitis syndrome (CAE): a review. *Vet. Res. Commun.*, v. 8, n. 4, p.53. 1984.
- ALI, O.A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. *Vet. Rec.*, v. 121, n. 6, p. 131-132, 1987.
- ALLUWAIMI, A.M., ABU-ELZEIN, E. M. E., HASSANEIN, M. M. Caprine arthritis-encephalitis antibodies in indigenous sheep in Saudi Arabia. *Rev. Med. Vet. Pays Trop.*, n. 43, v. 4, p. 444-445, 1990.
- ALVES, F.S.F., PINHEIRO, R. R. Presença da Artrite Encefalite Caprina a Virus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25. 1997. Gramado-RS. *Anais...* Gramado: 1997, p. MVP 008.
- ANDRIOLI, A., GOUVEIA, A.M.G., PINHEIRO, R.R., ROCHA, M.A., MARTINS, A., SANTOS, D.O. Detecção do DNA pró-viral do lentivirus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Bras. Repr. Animal*, v. 23, n.3, p. 420-421, 1999.

- ARCHAMBAULT, D., EAST, N., PERK, K., DAHLBERG, J.E. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, n. 5, p. 971-975, 1988.
- ASSIS, A.P.M.V. *Evidência sorológica da ocorrência de lentivírus (Maedi Visna / Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará de 1991 a 1993.* Belo Horizonte - MG: Escola de Veterinária - UFMG, 1994. 61 p. Dissertação (Mestrado)
- ASSIS, A.P.M.V., GOUVEIA, A.M.G. Evidências sorológicas de lentivírus (Maedi Visna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de MG., RJ., BA., CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 23, Recife-PE, 1994. *Anais...* Recife: 1994, p. 104.
- ASTUDILLO, V. M. *Encuestas por muestro para estudios epidemiológicos en poblaciones animales.* Rio de Janeiro: Organización Panamericana de la Salud - Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 1979. 60p.
- AZEVEDO, C.F. de *Criação de caprinos e ovinos no nordeste.* Natal, EPARN, 1982. (EPARN. Boletim técnico, 12).
- BAKER, G., SOUSA NETO, J. *Características gerais da caprinocultura leiteira no estado do Rio Grande do Norte.* Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1987. (EMBRAPA-CNPC. Boletim de Pesquisa, 9).
- BECH-NIELSEN, S., SHULAW, W.P., FRANDSEN, P.L., JORGENSEN, J.B., AHRENS, P., FELD, N.C. Use of a dot enzyme-linked immunosorbent assay on absorbed sera for the diagnosis of bovine paratuberculosis. *Rev. Sci. Tech.*, v. 12, n. 2 p. 617-627, 1993.
- BELINO, E.D., EZEIFEKA, G.O. Maedi-visna antibodies in sheep and goats in Nigeria. *Vet. Rec.*, v. 114, p. 570, 1984.
- BELOV, L., WHALLEY M. Virus-specific polypeptides do caprine arthritis-encephalitis virus recognized by monoclonal antibodies to virion proteins p24 and p14. *J. Gen. Virol.*, v. 69, p. 1097-1103, 1988.
- BERGER, N., HELLER, A.E., STORMANN, K.D., PFAFF, E. Characterization of chimeric enzymes between caprine arthritis-encephalitis virus, maedi-visna virus and human immunodeficiency virus type 1 integrase expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.*, v. 82, n.1, 2001.
- BERTONI, G., ZAHNO, M. L., ZANONI, R., VOGT, H. R., PETERHANS, E., RUFF, G., CHEEVERS, W. P., SONIGO, P., PANCINO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with development of arthritis. *J. Virol.*, v. 68, n. 11, p. 7139-7147, 1994.
- BJERRUM, O.J., HEEGAARD, N. H. H. *Handbook of Immunoblotting of Proteins: technical descriptions.* v. 1, Florida: CRC Press, 1988. 265p
- BLACKLAWS, B.A., BIRD, P., McCONNELL, I. Pathogenesis and immunity in lentivirus infections of small ruminants. In: GODDEERIS, B.M.L. & MORRISON, W.I. *Cell-Mediated Immunity in Ruminants.* Boca Raton: CRC Press, 1994. 250p.
- BOCTOR, F.N., CALISHER, C.H., PETER, J.B. Dot-ELISA for serodiagnosis of human infections due to Western Equine Encephalitis virus. *J. Virol. Methods.* v. 26, n. 3, p.305-311, 1989.
- BOCTOR, F.N., STEK, M.J. Jr, PETER, J.B., KAMAL, R. Simplification and standardization of dot-ELISA for human *Schistosomiasis mansoni*. *J. Parasitol.*, v. 73, n. 3, 589-592, 1987.
- BOSHOFF, C.H.B., DUNGU, R., WILLIAMS, J., VORSTER, J.D., CONRADIE, D.W., VERWORERD, D., YORK, F. Detection of Maedi-Visna virus-antibodies using a single fusion transmembrane-core p25 recombinant protein ELISA and modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. *J. Virol. Methods.* v.63, p. 47-56, 1997.
- BRANCH, S.L., LEVETT, P.N. Evaluation of four methods for detection of

- immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 6, n. 4, p. 555-557, 1999.
- BRODIE, S., PEARSON, L., ZINK, M., BICKLE, H., ANDERSON, B., MARCOM, K., DEMARTINI, J. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Pathol.*, v.146, p.250-263, 1995.
- BROWN, C. *In situ* hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. *Vet. Pathol.*, v. 35, n.3., p.159-167, 1998.
- BRUGERE-PICOUX, J. The caprine arthritis encephalitis complex. *Rec. Méd. Vét.*, v. 160, n. 4, p. 319-327, 1984.
- BURGU, I., AKÇA, Y., ALKAN, F., OZKUL, A., KAROGLU, T., ÇABALAR, M. Antibody prevalence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in goats in Turkey. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, v. 101, n. 10, p.390-391, 1994.
- CALDAS, E.M., SANTANA, A. F., CAETANO, A.L.S., COSTA, J.A. Estudo da ovinocaprinocultura na região nordeste do Estado da Bahia. *Arq. Esc. Med. Vet. UFBA*, v.12, n.1, p:1-98, 1989.
- CAMARGO, E.D., NAKAMURA, P.M., VAZ, A.J., da SILVA, M.V., CHIEFFI, P.P., DE MELO, E.O. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocaríasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 34, n. 1, p. 55-60, 1992.
- CARRUTH, L.M., MORSE, B.A., CLEMENTS, J.E. The leucine domain of the visna Tat protein mediates targeting to an AP-1 site in viral long terminal repeat. *J. Virol.*, v.70, p.4338-4344, 1996.
- CASTRO, R.S. *Lentivirus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 1998. 132p. Tese (Doutorado).
- CASTRO, R.S., LEITE, R.C., AZEVEDO, E.O., TABOSA, I., NASCIMENTO, S.A., OLIVEIRA, M.M.M., COSTA, L.S.P., ALENCAR, C.A.S., CALLADO, A.K.C., MELO, L.E.H., FREITAS, A.A. Anticorpos contra lentivirus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna) em caprinos sem raça definida dos estados de Pernambuco e Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 27, Águas de Lindóia-SP. *Anais...* Águas de Lindóia: 2000. p. 104.
- CASTRO, R.S., NASCIMENTO, S.A., ABREU, S.R.O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do estado de Pernambuco. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 46, n.5, p. 571-572, 1994.
- CELER Jr, V., CELER, V., NĚMCOVÁ, H., ZANONI, R.G., PETERHANS, E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *J. Vet. Med. B.*, v. 45, p. 183-188, 1998.
- CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K., NARAYAN, O. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.*, v.77, p.2037-2051, 1996.
- CHEBLOUNE, Y., SHEFFER, D., KARR, B.M., STEPHENS, E., NARAYAN, O. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell culture. *Virology*, v. 222, p. 21-30, 1996.
- CHEEVERS, W. P., HOTZEL, I., BEYER, J.C., KUMPULA-McWHIRTER, N. Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus gene caprine interleukin-12. *Vaccine*, n. 22, v.23, p.2494-2503, 2000.
- CHEEVERS, W. P., KNOWLES, D. P., McGUIRE, T. C., CUNNINGHAM, D. R., ADAMS, D. S., GORHAM, J. R. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. *Lab. Inv.*, v. 58, n. 5, p. 510-517, 1988b.
- CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C. The

- lentiviruses: MAEDI/VISNA, Caprine Arthritis-encephalitis and Equine Infectious Anemia. *Adv. Virus Res.*, v. 34, p. 189-215, 1988a.
- CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C., NORTON, L., CORDERY-COTTER, R., KNOWLES, D. P. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. *Virology*, v.196, p.835-839, 1993.
- CHEEVERS, W. P., ROBERSON, S., KLEVJER-ANDERSON, P., CRAWFORD, T.B. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Arch. Virol.*, v. 67, n. 1, p. 111-117, 1981.
- CHEEVERS, W. P., STEM, T. A., KNOWLES, D. P., McGUIRE, T. C. Precursor polypeptides of caprine arthritis-encephalitis lentivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.*, v. 69, n. 3, p. 675-681, 1988a.
- CLAVIJO, A., THORSEN, J. Chemiluminescent detection of caprine arthritis-encephalitis virus a PCR-generated single stranded non radiolabelled probe. *Vet. Microbiol.*, v. 43, p. 295-305, 1995a.
- CLAVIJO, A., THORSEN, J. Bacterial expression of the caprine arthritis-encephalitis virus *gag* and *env* proteins and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, n. 7, 1995b.
- CLEMENTS, J.E., NARAYAN, O., CORK, L.C. Biochemical characterization of the virus causing leucoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, p. 423-427, 1980.
- CLEMENTS, J.E., PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Vir. Res.*, v.32, p.97-109, 1994.
- CLEMENTS, J.E., ZINK, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinic. Microbiol. Rev.*, v.9, n.1, p. 100-117, 1996.
- COACKLEY, W., SMITH, V. W., MAKER, D., DICKSON, J. Isolation of caprine syncytial retroviruses. *Aust. Vet. J.*, v. 57, n.10, p. 480-481, 1981.
- COFFIN, J.M. Retroviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.N. et al. *Fields Virology*. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1767-1847.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas: Editora da UNICAMP, 1993. 97p.
- CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.
- CONCHA-BERMEJILLO, A., BRODIE, S.J., MAGNUS-CORRAL, S., BOWEN, R.A., DeMARTINI, J.C. Pathologic and serological responses of isogenic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol.*, v.8, p.1 16-123, 1995.
- CONCHA-BERMEJILLO, A., MAGNUS-CORRAL, S., BRODIE, S.J., DeMARTINI, J.C. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.*, v. 57, n. 5, p. 684-688, 1996.
- CORK, L. C. Differential diagnosis of viral leucoencephalomyelitis of goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 169, n. 12, p. 1303-1306, 1976.
- CORK, L. C., HADLOW, W. J., CRAWFORD, T. B., GORHAM, J. R., PIPER, R. C. Infections leucoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.*, v. 129, p. 134-141, 1974.
- CRANE, S.E., BUZI, J., CLEMENTS, J.E. Identification of cell membrane proteins that bind visna virus. *J. Virol.*, v.65, p.613-761 43, 1991.
- CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 178, n. 7, p. 713-719, 1981.
- CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S., CHEEVERS, W. P., CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v.207, p.997-999, 1980.
- CUNHA, R.G., NASCIMENTO, M.D. Ocorrência de anticorpos para o vírus da

- AEC em soros de caprinos do estado do Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.17, n.2, 1995.
- CUTLIP, R.C., JACKSON, T.A., LAIRD, G.A., WEAVER, A. L. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, v. 33, n p. 1081-1084, 1977.
- CUTLIP, R.C., LAIRD, G.A. Isolation and characterization of a virus associated with progressive pneumonia (maedi) of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v. 37, n. 12, p. 1377-1382, 1976.
- CUTLIP, R.C., LEHMKUHL, H.D., SACKS, J.M., et al. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 200, n.6, p. 802-805, 1992.
- CUTLIP, R.C., LEHMKUHL, D., SCHMERR, M.J.F., BROGDEN, K.A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet. Microbiol.*, v.17, p. 237-250, 1988.
- DAHLBERG, J. E., GASKIN, J. M., PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*, v. 39, n. 3, p. 914-919, 1981.
- DALZIEL, R.G., HOPKINS, J., WATT, N.J., DUTIA, B.M., CLARKE, H.A., McCONNELL, I. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J. Gen. Virol.*, 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 60, p.131-147, 1997.
- DAWSON, M. Caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna: complex disease syndromes associated with lentivirus infections of goats and sheep. *Goat Vet. Society J.*, v. 4, n. 2, p. 25-28, 1983.
- DAWSON, M. Caprine arthritis-encephalitis. *In practice*, v. 9, n. 1, p. 8-11, 1987.
- DAWSON, M. The caprine arthritis encephalitis syndrome. *Vet. Annual*, v. 29, p. 98-102, 1989.
- DAWSON, M., BIRONT, P., HOUWERS, D.J. Comparison of serological tests used in three state veterinary laboratories to identify maedi-visna virus infection. *Vet. Rec.*, v. 111, n. 19, p. 432-434, 1982.
- DAWSON, M., JEFFREY, M., CHASEY, D., VENABLES, C., SHARP, J. M. Isolation of a syncytium-forming virus from a goat with polyarthritis. *Vet. Rec.*, v. 112, n. 14, p. 319-321, 1983.
- DAWSON, M., WILESMITH, J. W. A report of the BHS/MAFF survey of CAE virus infection in british goat herds. *Brit. Goat Society Monthly J.*, v. 77, n. 10, p. 428-431, 1984.
- DAWSON, M., WILESMITH J. W. Serological survey of lentivirus (Maedi-visna/caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds. *Vet. Rec.*, v. 117, n. 4, p. 86-9, 1985.
- De BOER, A. J. de; GUTIERREZ, A., SOUZA NETO, J. Farm-level resources for small ruminant production. In: REUNIÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DO PROGRAMA DE APOIO À PESQUISA COLABORATIVA DE PEQUENOS RUMINANTES, 1, 1986. Sobral-CE. *Anais...* Sobral-CE: 1986. p.9-36.
- DEAN, A. G., DEAN, J. A., BURTON, A. H., DICKER, R. C. *Epi-info, version 6: a word processing, database and statistic program for epidemiology on micro-computers*. Atlanta, Georgia, Center for Disease Control, 1992. 302p.
- DEAN, P.D.G., JOHNSON, W.S., MIDDLE, F.A. *Affinity Chromatography: principles and methods*. Oxford: Pharmacia Fine Chemicals - IRL Press, 1985. 112p.
- DING, E.Y., XIANG, W.H. Immune response in goats to caprine arthritis-encephalitis virus. *Viral Immun.*, v. 10, n. 2, p. 111-115, 1997.
- DIXON, R.J., OLIVER, R.E., McNIVEN, R.A. Biochemical characterization of caprine arthritis-encephalitis virus. *N. Zeal. Vet. J.*, v. 32, p. 40, 1983.

- DRAELANTS, E., HOFKENS, E., HARDING, E., BRANDT, J., GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. *Res. Vet. Sci.*, v. 58, n. 1, p. 99-100, 1995.
- EAST, N.E., ROWE, J.D., DAHLBERG, J.E., THEILEN, G.H., PEDERSEN, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Ruminant Res.*, v.10, p.251-262, 1993.
- EAST, N.E., ROWE, J.D., MADEWELL, B.R., FLOYD, K. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 190, n. 2, p. 182-186, 1987.
- ELLIS, T.M. Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus infected goats. *Aust. Vet. J.*, v. 67, n.8, p.302-303, 1990.
- ELLIS, T.M., ROBINSON, W., WILCOX, G. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. *Aust. Vet. J.*, v.60, p.326-329, 1983.
- ELLIS, T.M., ROBINSON, W., WILCOX, G. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Aust. Vet. J.*, v. 65, n.3, p.69-73, 1988.
- ELLIS, T.M., WILCOX, G. E., ROBINSON, W. F. Antigenic variation of caprine arthritis encephalitis virus during persistent infection of goats. *J. Gen. Virol.*, v. 63, n. 12, p. 3145-3152, 1987.
- EMBRAPA. Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV) (subprojeto Nº 06.0.94.102-01). Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. 1994, 125p.
- EMBRAPA. Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV-II) (subprojeto Nº 06.0.94.102-01). Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. 1996a, 110p.
- EMBRAPA. Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus no Nordeste. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. 1996b, 16p.
- FERNANDES, M. A. *Artrite Encefalite Caprina: Contribuição para o estudo epidemiológico em rebanhos leiteiros criados no Estado de São Paulo*. São Paulo, SP: USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1997. 83 p. Dissertação (Mestrado- Clínica veterinária).
- FERREIRA, R.A., MINEO, J.R., DUARTE, J.M., SILVA, D.A., PATARROYO, J.H. Toxoplasmosis in naturally infected deer from Brazil. *J. Wildl. Dis.*, v.33, v.4, p. 896-899, 1997.
- FITERMAN, I. R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no estado da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA. 21. Salvador-BA. *Anais...* Salvador: 1988. p. 33.
- GARCIA, M., GALHARDO, M., ARAÚJO, W.P., D'ANGELINO, J.L., BASTOS, P.S., ROSSINI, A.J. Caprine arthritis-encephalitis (CAE). Occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. *Trop. An. Health Prod.*, v.24, p.164, 1992.
- GDOVIN, S.L., CLEMENTS, J.E. Molecular mechanisms of Visna virus tat: identification of the targets for transcriptional effect. *Virology*, v. 188. p.438-450, 1992.
- GEE, R. W. Progressive goat pneumonia syndrome. *Aust. Vet. J.*, v. 57, p. 483, 1981.
- GENDELMAN, H.E., NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S., KENNEDY, P.G.E., GHOTBI, Z., CLEMENTS, J.E., STANLEY, J., PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.*, n.58, n.1, 1986.
- GIANGASPERO, M., VANOPDENBOSCH, E., NISHIKAWA, H. Lentiviral arthritis and encephalitis in goats in north-west Syria. *Rev. Méd. Vét. Pays Trop.*, v. 45, n. 3/4, p. 241, 1992.

- GOGOLEWSKI, R.P., ADAMS, D.S., McGUIRE, T.C., BANKS, K.L., CHEEVERS, W.P. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, v. 66, p. 1233-1240, 1985.
- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 724, p.22-42, 1994.
- GONZÁLES, L., GELABERT, J.L., MARCO, J.C., SAEZ DE OXARIZ, C. Caprine arthritis-encephalitis in the Basque country, Spain. *Vet. Res.*, v. 120, n. 5, p. 102-109, 1987.
- GOUVEIA, A. M. *Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus Pneumonia Progressiva Ovina (OPP) - Maedi-Visna (MVV) - Artrite Encefalite Caprina (CAEV)*. Sobral, 1994. 4p. (mimeografado).
- GOUVEIA, A.M.G., COURA, M.A., BRANDÃO, H.M., ATANÁSIO, C. Distribuição sorológica do lentivírus caprino em amostragem por demanda. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG, 16, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG, 1998. p. 116. Resumo.
- GOUVEIA, A.M.G., MELO, L.M., PIRES, L.L., PINHEIRO, R.R. Microimunodifusão em gel de ágar para o diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 27, Águas de Lindóia-SP. *Anais...* Águas de Lindóia: 2000. p. 33. Resumo.
- GOUVEIA, A. M., SANTA ROSA, J., PINHEIRO, R. R., ALVES, F. S. F., VIDAL, C. E. S. Implantação de um programa de controle da CAEV em sistemas epidemiológicos distintos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 23, Recife-PE. *Anais...* Recife: 1994. p. 102. Resumo.
- GRANT, G.H., JOHNACHAN, P.M., OLIVEIRA, D., PITTEKSON, S. Seroprevalence of caprine arthritis encephalitis in the Jamaican goat population. *Trop. An. Health Prod.*, v. 20, n. 3, p. 181-182, 1988.
- GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, n. 22, v. 1-2, p. 71-87, 1995.
- GREWAL, A.S., GREENWOOD, P.E., BURTON, R.W., SMITH, J.E., BATTY, E.M., NORTH, R. Caprine retrovirus infection in New South Wales: virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody. *Aust. Vet. J.*, v.63, p.245-248, 1986.
- GUEDES, M.I.M.C. *Infecção experimental pelo vírus da artrite encefalite caprina em cabritos de nove a vinte e sete dias de idade*. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 1999. 59p. Dissertação (Mestrado).
- GUTIERREZ, N. A., De BOER, A. J. de; ALVES, J. U. *Interações de recursos e características econômicas dos criadores de ovinos e caprinos no sertão do Ceará, Nordeste do Brasil: resultados preliminares*. Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1981. (EMBRAPA-CNPC. Boletim de Pesquisa, 3).
- GUTIERREZ, N. A., SOUZA NETO, J., BAKER, G., DE BOER, A. J. de Exploração de pequenos ruminantes no Estado do Ceará: uma visão do capital, renda e custo. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 24, n. 5, p. 509-516, 1989.
- HAASE, T.A. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*, v.322, p.130-136, 1986.
- HAASE, T.A., BARINGER, J.R. The structural polypeptides of RNA slow viruses. *Virology*, v. 57, p. 238-250, 1974.
- HANSON, J., HYDBRING, E., OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Vet. Scand.*, v. 37, n. 1, p. 31-39, 1996.
- HARLON, E., LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 865p.

- HARMACHE, A., BOUYAC, M., AUDOLY, G., HIEBLOT, C., PEVERI, P., VIGNE, R., SUZAN, M. The *vif* gene is essential for efficient replication of caprine arthritis encephalitis virus in goat synovial membrane cells and affects the late steps of the virus replication cycle. *J. Virol.*, v.69, p.3247-3257, 1995.
- HARMACHE, A., VITU, C., GUIGUEN, F., RUSSO, P., BERTONI, G., PEPIN, M., VIGNE, R., SUZAN, M. Priming with *tat*-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. *J. Virol.*, v.72, n.8, 1998.
- 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. *Can. J. Vet. Res.*, v.56, p.237-241, 1992.
- HEIL, G. Serological survey of the occurrence of caprine arthritis encephalitis in pedigree goat herds in Badenwurttemberg, German Federal Republic. *Tierärztliche Umschau*, v.418, p.530-532, 1986.
- HESS, J.L., SMALL, J.A., CLEMENTS, J.E. Sequences in the Visna virus Long Terminal Repeat that control transcriptional activity and respond to viral *trans*-activation: Involvement of AP-1 sites in basal activity and *trans*-activation. *J. Virol.*, v. 63, n.7, p. 3001-3015, 1989.
- HÖTZEL, I., BASTOS, E. S., RAVAZZOLO, A.P., MOOJEN, V. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 23, p. 1175-1179, 1993.
- 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. *Vet. Microbiol.*, v.7, p.209-219, 1982.
- HOUWERS, D.J., VAN DER MOLEN, E. J. First cases of caprine arthritis-encephalitis in the Netherlands. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v. 112, n. 18, p. 1054-61, 1987.
- HOUWERS, D.J., NAUTA, I.M. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infection. *Vet. Microbiol.*, v.41, p.6557-665, 1989.
- HOUWERS, D.J., SCHAAKE, Jr. J. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods*, v. 98, n.1, 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. *J. Vet. Med. B.* v. 34, p. 421-431, 1987.
- HULLINGER, G. A., KNOWLES, D. P., McGUIRE, T. C., CHEEVERS, W. P. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology*, v. 192, n. 1, p. 328-331, 1993.
- HURN, B.A.L., CHANTLER, S.M. Production of reagent antibodies. *Methods enzymol.*, v.70, p-104-142, 1980.
- HUSO, L.D., NARAYAN, O., HART, W.G. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virol.*, v.62, p.1974-1980, 1988.
- IBARRA, F., MONTENEGRO, N., VERA, Y., BOULARD, C., QUIROZ, H., FLORES, J., OCHOA, P. Comparison of three ELISA tests for seroepidemiology of bovine fascioliasis. *Vet. Parasitol.* v. 77, n. 4, p.229-236, 1998.
- IBGE. Censo Agropecuário 1995-1996. Rio de Janeiro: 1999, 1.p. <http://www.sidra.ibge.gov.br/>.
- JACOBS, E., FUCHTE, K., BREDT, W. A 168-kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae* used as antigen in a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, v. 5, n. 4, p.435-440, 1986.
- JAN, C.L., GREENLAND, T., GOUNEL, F., BALLEYDIERS, MORNEX, J.F.

- Activation of small ruminant aortic endothelial cells after *in vitro* infection by caprine arthritis encephalitis virus. *Res. Vet. Sci.*, v. 69, n.3, p. 225-231, 2000.
- JAYAKUMAR, R., THIRUMURUGAN, G., NACHIMUTHU, K., PADMANABAN, V.D. Detection of rabies virus antigen in animals by avidin-biotin dot ELISA. *Zentralbl. Bakteriol.*, v. 285, n. 1, p. 82-85, 1996.
- JIMÉNEZ, C., MONTERO, D., VILLALOBOS, P., ROJAS, J. L., CORDEIRO, L., MORALES, J. A., RODRÍGUES, L. Caprine arthritis-encephalomyelitis: first diagnosis of this retroviral disease in goats in Costa Rica. *Cienc. Vet.(Heredia)*, v. 14, n. 1, p. 59-63, 1992.
- JOAG, S.V., STEPHENS, E.B., NARAYAN, O. Lentiviruses. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.N. *Fields Virology*. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1977-1996.
- JOHNSON, G.C., BARBET, A.F., KLEVJER-ANDERSON, P., McGUIRE, T.C. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infect. Immun.*, v. 41, n. 2, p. 657-65, 1983.
- KENNEDY-STOSKOPF, S., NARAYAN, O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. *J. Virol.*, v.59, p.37-44, 1986.
- KLEIN, J.R., MARTIN, J., GRIFFING, S., NATHANSON, N. Precipitating antibodies in experimental visna and natural progressive pneumonia of sheep. *Res. Vet. Sci.*, v. 38 p. 129-133, 1985.
- KLEVJER-ANDERSON, P., ANDERSON, L. W. Caprine arthritis-encephalitis virus infection of caprine monocytes. *J. Gen. Virol.*, v. 58, n. 1, p. 195-198, 1982.
- KNIGHT, A. P., JOKINEN, M.P. Caprine arthritis-encephalitis. *Compen. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v. 4, p. 263-270, 1982.
- KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, p.1-11, 1997.
- KNOWLES, D.P., EVERMANN, J.F., SHROPSHIRE, C., VANDERSCHALIE, J., BRADWAY, D., GEZON, H.M., CHEEVERS, W. P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microb.* v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.
- KUMAR, S., MALHOTRA, D.V., DHAR, S. Serodiagnosis of Babesia equi infection - a comparison of Dot-ELISA, complement fixation test and capillary tube agglutination test. *Vet. Parasitol.* v. 69 n.3-4, p.171-176, 1997.
- KWANG, J., CUTLIP, R.C. Analysis of antibody response to ovine lentivirus by using viral gene products expressed in a prokaryotic system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 188, p. 20-27, 1992.
- KWANG, J., KEEN, J., CUTLIP, R.C., KIM, H.S., CONCHA-BERNIEJILLO, A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. *Small Ruminant Res.*, v.16, n. 2, p. 171-177, 1995.
- LAEMMI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-685, 1970.
- LAIRMORE, M.D., AKITA, G.Y., RUSSEL, H.I., DeMARTINI, J.C. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with *in vivo* pathogenicity. *J. Virol.*, v.61, p.4038-4042, 1987.
- LE GUILLOU, S. Pathologie mammaire et production laitière. *La Chevre*, v. 174, p. 30, 1989.
- LECHNER, F., MACHADO, J., BERTONI, G., SEOW, H.F., DOBBELAERE, D.A. PETERHANS, E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. *J. Virol.*, v.71, n.10, p.7488-7497, 1997.

- LEONARDI, M.S., GAZZARA, D., ZUMMO, S., FATTAL-GERMAN, M., BIZZINI, B., MASTROENI, P. A dot-ELISA for the detection of IgG antibodies to mumps and varicella viruses. *J. Clin. Lab. Anal.* v. 4, n. 3, 165-169, 1990.
- LERONDELLE, C. Mammary infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *Sci. Vet. Med. Comp.*, v. 90, n. 3, p. 145-150, 1988.
- LERONDELLE, C., GODET, M., MORNEX, J.F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet. Res.*, n.30, v.5, 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. *J. Dairy Sci.*, v.78, p.850-855, 1995.
- LEROUX, C., CHASTANG, J., GREENLAND, T., MORNEX, J.F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, v. 142, p. 1125-1137, 1997.
- LEROUX, C., CORDIER, G., MERCIER, I., CHASTANG, J., LYON, M., QUÉRAT, G., GREENLAND, T., VIGNE, R., MORNEX, J.F. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. *Arch. Virol.*, v. 140, p. 1-11, 1995.
- LEROUX, C., GREENLAND, T., MORNEX, J.F. Molecular characterization of field isolates of lentiviruses of small ruminants. *AIDS Res. Human Retrovir.*, v. 12, n. 5, p. 427-429, 1996.
- LI, T.Y., JIN, N.Y., WANG, H.W., GUO Z.R., FANG, H.H., AN, R.G., YIN, Z. Expression and characterization of HIV-1 gag p17-p24 protein. *Sheng Wu Kung Cheng Hsueh Pao*, v. 16, n. 1, p.65-68, 2000.
- LICHTENSTEIGER, C.A., CHEEVERS, W.P., DAVIS, W.C. CD8+ cytotoxic T-lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis encephalitis virus. *J. Gen. Virol.*, v.74, p.2111-2116, 1993.
- LLAMES, L., GOYACHE, J., DOMENECH, A., De AVILA, A., SUAREZ, G., GOMEZ-LUCIA, E. Rapid detection of specific polyclonal and monoclonal antibodies against bovine leukemia virus. *J. Virol. Methods*, v. 82, n. 2, p.129-136, 1999.
- LOUNG, R. Z., LIU, C. H., PAN, C. I. An outbreak of caprine arthritis-encephalitis in Taiwan. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.*, v. 19, n. 4, p.215-220, 1993.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 2655-2755, 1951.
- LUJÁN, L., BEGARA, I., COLLIE, D.D.S., WATT, N.J. Ovine lentivirus (maedi-visna virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. *Vet. Pathol.*, v.31, p.695-703, 1994.
- MacKENZIE, R. W., OLIVER, R. E., ROOKEN, J. P., KAGEY, H. A successful attempt to raise goat kids free of infection with Caprine Arthritis-encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *N. Zeal. Vet. J.*, v. 35, n. 11, p. 184-196, 1987.
- MAGALHÃES, H. H. Diagnóstico de situação da caprinocultura em algumas microregiões dos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro - Resultados Preliminares. *Cabra & Bodes*, v 1. p. 5-7, 1985.
- MAITI, N.K., SAINI, S.S., SINGH, R., OBEROI, M.S., SHARMA, S.N. An improved dot ELISA to detect fowl adenovirus type-1 antigen. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 16, n. 3, p.245-250, 1993.
- MANCIANTI, F., PEDONESE, F., POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet. Parasitol.*, v. 65, n. 1-2, p.1-9, 1996.
- MARCHESIN, D.M. Caracterização molecular de parte do gene gag dos lentivirus artrite-encefalite caprina (CAEV) e maedi-visna dos ovinos (MVV), isolados de animais naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, RS:

- UFRGS - Faculdade de Veterinária, 1997. 111p. Dissertação (Mestrado- Ciências Veterinárias).
- MARCOM, K. A., PEARSON, L. D., CHUNG, C. S., POULSON, J. M., DeMARTINI, J. C. Epitope analysis of capsid and matrix proteins of North American ovine lentivirus field isolates. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, n. 7, p.1472-1479, 1991.
- MASLAK, D.M., SCHMERR, M.J. Antigenic relatedness between ovine progressive pneumonia virus (OPPV) and HIV-1. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* v. 16, n. 2, p. 103-111, 1993.
- McGRATH M., WITTE, O., PINCUS, T., WEISSMAN, I.L. Retrovirus purification: Method that conserves envelop glycoprotein and maximizes infectivity. *J. Virol.*, v. 25, n.3, p.923-927, 1978.
- McGUIRE, T. C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in Caprine Arthritis-encephalitis infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 17, p. 465-470, 1987.
- McGUIRE, T. C., ADAMS, D. S., JOHNSON, G. C., KLEVJER-ANDERSON, P., BARBEE, D., GORHAM, J. R. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, n. 3, p. 537-540, 1986.
- McGUIRE, T. C., O'ROURKE, K. I., KNOWLES, D. P., CHEEVERS, W. A. Caprine arthritis encephalitis lentivirus transmission and disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, n. 160, p. 61-75, 1990.
- McKINNEY, M. M., PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascitic fluid. *J. Immunol. Methods*, v. 96, n. , p. 271-278, 1987.
- MDURVWA, E. G., OGUNBIYI, P. O., GAKOU, H. S., REDDY, P. G. Pathogenic mechanisms of caprine arthritis-encephalitis virus. *Vet. Res. Communic.*, v. 18, n. 6, p. 483-490, 1994.
- MELO, A.C.M. *Soroprevalência da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros da região da Grande Fortaleza - Ceará.* Fortaleza, CE: UECE - Curso de Veterinária, 1996. 60p. Dissertação (Mestrado).
- MELO, A.C.M., FRANKE, C.R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.27, n.1, p. 113-117, 1997.
- MILCZEWSKI, V., SOTOMAIOR, C., REISCHAK, D., VON GROLL, A. Relato do primeiro isolamento do vírus maedi-visna no estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado-RS. *Anais...* Gramado: 1997, p. 179. Resumo.
- MOOJEN, V. *Caracterização de isolados de lentivirus de pequenos ruminantes naturalmente infectados, do Rio Grande do Sul, Brasil.* Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996. 247p. Tese (Doutorado).
- MOOJEN, V., SOARES, H.C., RAVAZZOLO, A.P., PIZZOL, M., GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi-visna/artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS*, v. 14, p.77-78, 1986.
- MONICAT, F. *Facteurs de risque des arthrites des caprins.* In: LES RENDEZ-VOUS DE L'ECOPATHOLOGIE, Lyon, France, 1987. Premiers resultats. Villeurbanne, Center Regional de L'Ecopathologie Multi-especies. Rhone-Alpes, 1987. p.1-28.
- MOTHA, M. X. J.; RALSTON, J. C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet. Microbiol.*, v. 38, n. 4, p.359-367, 1994.
- 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, n.1, 67-73, 1999.
- MURPHY, F. A., FAUQUET, C. M., BISHOP, D. H. L., GHABRIAL, S. S., JARVIS, A. W., MARTELLI, G. P., MAYO, M. A., SUMMERS, M.D., Virus taxonomy. *Arch. Virol.*, v. 10, p. 193-204, 1995.
- NAKANE, P.K., KAWOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 22, p. 1084-1091, 1974.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, v.70, p.1617-1639, 1989.
- NARAYAN, O., CLEMENTS, J. E., STRANDBERG, J. D., CORK, L. C., GRIFFIN, D. E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, n. 1, p. 69-79, 1980.
- NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D., GRIFFIN, D.E., CLEMENTS, J.E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect. Immun.*, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.
- NARAYAN, P., SHEFFER, D., GRIFFIN, D.E., CLEMENTS, J., HESS, J. Lack of neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Virol.*, v.49, p.349-355, 1984.
- NAZARA, S. de J., TRIGO, F. J., SUBERBIE, E., MADRIGAL, V. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis in Mexico. *Tec. Pec. México*, v. 48, p. 98-101, 1985.
- NEUVEUT, C., VIGNE, R., CLEMENTS, J.E., SIRE, J. The visna transcriptional activator *tat*: effects on the viral LTR and on cellular genes. *Virology*, v.197, p.236-244, 1993.
- NORD, K., ADNOY, T. Effects of infection by caprine arthritis-encephalitis virus on milk production of goats. *J. Dairy Sci.*, v. 80, n. 10, p. 2391-2397, 1997.
- NORMAN, S., SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis: review of the neurologic form in 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 182, n.12, p. 1342-1345, 1983.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. World Organization for Animal Health. p. 369-373, 1996.
- OLIVEIRA, L.H.S. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. 368p.
- OLIVEIRA, J.A.M., BRAGA, G.M., DIAS, P. M., ZACHARIAS, F., MARANHÃO, A. G. de M., MENDES, P. A. C., MOURA FILHO, B. J. Avaliação da adoção das tecnologias usadas pelos criadores de caprinos e de ovinos tropicais dos estados da Bahia, Piauí, Pernambuco e Ceará. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 2, 1995, Londrina-PR. *Anais...*Londrina: 1995. p. 128-147.
- OLIVER, R. E., ADAMS, D. S., GORHAM, J. R., JULIAN, A. F., McNIVEN, R. A., MUIR, J. Isolation of caprine arthritis-encephalitis virus from goat. *N. Zeal. Vet. J.*, v. 30, n. 10, p. 147. 1982.
- OLIVER, R.E., GORHAM, J.R., PARISH, S.F., HADLOW, WJ., NARAYAN, O. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. *Am. J. Vet. Res.*, v. 42, n. 9, p. 1554-1559, 1981.
- O'SULLIVAN, B.M., EAVES, F.W., BAXENDELL, S.A., ROWAN, K.J. Leucoencephalomyelitis of goat kids. *Aust. Vet. J.*, v. 54, p. 479-483, 1978.
- OZYORUK, F., CHEEVERS, W.P., HULLINGER, G.A., McGUIRE, T.C., HUTTON, M., KNOWLES, D.P. 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. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, n.1, p.44-51, 2001.
- PÁLFI, V., HAJTÓS, I., GLÁVIS, R., MALKI, G. Occurrence of the retrovirus

- associated caprine arthritis-encephalitis (CAE) syndrome in Hungary. *Magyar Allatorcosk Lapja*, v. 41, n. 6, p.335-342, 1986.
- PALMER, M.V., OLSEN, S.C., CHEVILLE, N.F. Safety and immunogenicity of *Brucella abortus* strain RB51 vaccine in pregnant cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 58, n. 5, p.472-477, 1997.
- PASICK, J. Maedi-Visna virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct species ou *quasispecies* and its implications for laboratory diagnosis. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 241-244, 1998.
- PAWLISCH, R. A., MAES, R. K. Caprine arthritis encephalitis virus isolated from Michigam goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, n. 9, p. 1811, 1984.
- PEREIRA, M.F. *Artrite-encefalite caprina a virus (CAE) - estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1995. 64p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- PERETZ, G., ASSO, J., DEVILLECHAISE, P. Le C.A.E.V.: revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. *Rev. Méd. Vét.*, v.144, p.93-98, 1993.
- PERK, K. Ungulate lentiviruses: Pathogenesis and relationship to AIDS. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 32, p. 97-127, 1988.
- PERK, K. Presence of viral particles in neural cells of goats with caprine arthritis encephalitis. *Res. Vet. Sci.*, v. 49, n.3, p. 367-369, 1990.
- PERK, K. Concealed locations of lentivirus in Caprine Arthritis Encephalitis System. *Virology*, v. 253, p.8-9, 1999.
- PERK, K., HOD, I. Studies on slow virus diseases of sheep and goats in Israel. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 2, p. 473-479, 1983.
- PERRIN, G. G. Caprine arthritis encephalitis. *Point Vét.*, v. 23, n. 139, p.713-718, 1991.
- PHELPS, S.L., SMITH, M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 203, n.12, p. 1663-1666, 1993.
- PINHEIRO, R. R., ALVES, F. S. F., GIRÃO, E. S., MEDEIROS, L. P. A., GIRÃO, R. N. Presença da Artrite-Encefalite Caprina a Virus (CAEV), em Teresina- Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1996, Goiânia-GO. *Anais...* Goiânia: 1996. p.161. Resumo
- PINHEIRO, R. R., EGITO, A. S., SANTA ROSA, J., PINHEIRO, A. A. *Artrite Encefalite Caprina Viral (CAEV)*. Sobral-CE, EMBRAPA-CNPC, 1989, 5p. (EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 19).
- PINHEIRO, R.R., GOUVEIA, A.M.G., ANDRIOLI, A. Prevalência da Artrite Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do Estado do Ceará. *Rev. Bras. Repr. Animal*. v. 23, n.3, p. 421-423, 1999.
- PINHEIRO R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Estado do Ceará-Brasil. *Ciência Rural*, v.31, n.3 p. , 2001.
- PINHEIRO R.R., GOUVEIA, A.M.G., ALVES, F.S.F., HADDAD, J.P. Aspectos zoo-sanitários da caprinocultura cearense. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, v.50, n.5, p. 534-543, 2000b.
- PINHEIRO, R.R., SANTA ROSA, J. Intoxicação experimental por Salsa (*Ipomoea asarifolia*) em caprinos: II- Hemograma, urinálise e dosagens bioquímicas séricas em exames anatomo-histopatológicos. In: RELATÓRIO TÉCNICO DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS 1987-1995, Sobral-CE, 1996. *Anais...* Sobral:EMBRAPA-CNPC, 1996. p.183-188.
- PINHEIRO, R.R., SANTA ROSA, J., ALVES, F.S.F. Parâmetros clínicos, exame do líquido sinovial e hemograma da artrite-encefalite caprina viral. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.22, n. 3, p. 128-130, 2000a.

- PRESTON, B., DOUGHERTY, J.P. Mechanisms of retroviral mutation. *Trends Microbiol.*, v.4, p. 16-21, 1996.
- QUÉRAT, G., AUDOLY, G., SONICO, P., VIGNE, R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMW, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. *Virology*, v. 175, p. 434-447, 1990.
- QUÉRAT, G., BARBAN, V., SAUZE, N., FILIPI, P., VIGNE, R., RUSSO, P., VITU, C. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *J. Virol.*, v.52, p.672-679, 1984.
- RAJYA, B.S., SINGH, C.M. The pathology of pneumonia and associated respiratory disease of sheep and goats. I. Occurrence of Jaagsiekte and Maedi in sheep and goats in India. *Am. J. Vet. Res.*, v.25, p.61-67, 1964.
- RAMIREZ, E., URIBE P., ESCANILLA, D., SANCHEZ, G., ESPEJO, R.T. Reactivity patterns and infection status of serum samples with indeterminate Western Immunoblot test for antibody to Human Immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.*, v. 30, n.4, p.801-805, 1992.
- RAMOS, O. de S., SILVA, A.C. dos S., MONTENEGRO, A.J.D., FREITAS, J. de A., WATANABE, N.A. Anticorpos para o vírus da artrite encefálica no município de Castanhal-Pará. *Bol. PCAP*, Belém, v. 25, p. 107-111, jan/jun, 1996.
- REDDY, P.G., SAPP, W.J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 11, p. 3042-3043, 1993.
- REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Higiene*, v.27, p. 493-497, 1938.
- REIS, J.K.P., LEITE, R.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. *Prev. Vet. Med.*, v.20, p.261-267, 1994.
- REISCHAK, D. *Lentivirus de pequenos ruminantes: imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos caprinos*. Porto Alegre: UFRGS - Faculdade de veterinária, 2000. 132p. Dissertação (Mestrado).
- RELATÓRIO TÉCNICO ANUAL DO CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE CAPRINOS / 1982-1986. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1989. 283p. (Relatório).
- REMOND, M., BOUTROUILLE, A. Comparasion de la sensibilités antigènes précipitantes dans le test dimmunodiffusionen gélose pour le dépistage sérologique du visna maedi du mouton et du virus de l'arthrite encéphalite caprine. *Rev. Méd. Vét.*, v. 141, n. 2, p.125-128, 1990.
- REYBURN, T.H., ROY, J.D., BLACKLAWS, A.B., SARGAN, R. WATT, J.N., McCONNELL, I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to Maedi-Visna virus. *Virology*, v.191, p. 1009-1012, 1992.
- RIBAS ANTUNEZ, M.A., FERNANDEZ, D., RODRIGUEZ, C., TORANO, I., PIMENTEL, T. Evaluation of a Dot ELISA for the detection of a Rotavirus antigen. *Rev. Cubana Med. Trop.*, v. 48, n. 1, p. 59-61, 1996.
- RIBEIRO, L.A.O. Risco de introdução de doenças exóticas pela importação de ovinos. *Bol. Lab. Reg. Diagn. -UFPEL.*, v13 p.39-44, 1993.
- RIMSTAD, E., EAST, N.E., TORTEN, M., HIGGINS, J., DeROCK, E., PEDERSEN, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, n. 11, p. 1858-1862. 1993.
- RIMSTAD, E., EAST, N., DeROCK, E., HIGGINS, J., PEDERSEN, N. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, v.134, p.345-356, 1994.
- ROBERSON, S.M., McGUIRE, T.C., KLEVJER-ANDERSON, P., GORHAM, J.R., CHEEVERS, W.P. Caprine arthritis-encephalitis virus is distinct from visna and progressive pneumonia viruses as measured by genome sequence homology. *J. Virol.* v.

44, n. 2, p. 755-758, 1982.

- ROBINSON, W.F. Chronic interstitial pneumonia in association with a granulomatous encephalitis in a goat. *Aust. Vet. J.*, v. 57, n. 127-131, 1981.
- ROBINSON, W.R., ELLIS, T.M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. *Aust. Vet. J.*, v. 63., p. 237, 1985.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. *Immunology*. 5.ed. London: Mosby, 1998. 423p.
- ROSATI, S., KWANG, J., TOLARI, F., KEEN, J. A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet. Res. Commun.*, v. 18, p. 73-80, 1994.
- ROSATI, S., PITTAU, M., TOLARI, F., ERRE, G., KWANG, J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. *Vet. Microbiol.*, v. 45, v. 4, p. 363-370, 1995.
- ROUSSELOT, C. *Preparation d'anticorps monoclonaux contre le virus visna maedi et leurs applications*. Lyon - França: Université Claude Bernard, 1988, 125p. Tese (Doutorado) apud REISCHAK, D. *Lentivirus de pequenos ruminantes: imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos e caprinos*. Porto Alegre: UFRGS - Faculdade de veterinária, 2000. 132p. Dissertação (Mestrado).
- ROWE, J.D., EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, v. 13, n 1, p. 35-53, 1997.
- ROWE, J.D., EAST, N.E., THURMOND, M.C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, p. 1858-1862, 1993.
- ROWE, J.D., EAST, N.E., THURMOND, M.C., FRANTI, C.E. Risk factors associated with Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection in goats on California dairies. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.510-514, 1991.
- ROWE, J. D., EAST, N. E., THURMOND, M. C., FRANTI, C. E., PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 12, p. 2386-2395, 1992.
- ROY, P., VENUGOPALAN, A.T. Dot-enzyme linked immunosorbent assay for demonstration of Newcastle disease virus infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 22, n. 1, p.27-31, 1999.
- RUSSO, P. Polyarthritides enzootiques virales caprines: isolament de l'agent pathogene. *Bull. Lab. Vet.*, v. 8, n. 5, p. 59-60, 1982.
- RUSSO, P. Isolation of a caprine arthritis-encephalitis virus (C.A.E.V) strain identification - serological diagnosis in field practice. In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 3, 1983. Ames, USA. *Anais...* Ames: 1983, v. 2. p. 733-737.
- RUSSO, P., VITU, C., BOURGOGNE, A., VIGNONI, M., ABADIE, G., DAVID, V., PÉPIN, M. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *Vet. Rec.*, v. 140, n. 18, p. 483-484, 1997.
- RUTKOSKI, J.K., WEREMCZ, R., REISCHAK, D., WENDELSTEIN, A.C., MOOJEN, V., RAVAZZOLO, A.P. Utilização da técnica de PCR para detecção do vírus da artrite-encefalite caprina. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10, 1998, Porto Alegre-RS. *Anais...* Porto Alegre: 1998. p. 96. Resumo.
- SALTARELLI, M., QUERAT, G., KONINGS, D.A.M., VIGNE, R., CLEMENTS, J. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*. v. 179, p. 347-364, 1990.
- SAMAN, E., VAN EYNDE, G., LUJAN, L., EXTRAMIANA, B., HARKISS, G., TOLARI, F., GONZALEZ, L., AMORENA, B., WATT, N., BADIOLA, J. A new sensitive serological assay for

- detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 6, n. 5, p. 734-740, 1999.
- SANNA, E., SANNA, M.P., VITALI, C.G., RENZONI, G., SANNA, L., SPANO, S., ROSSI, G., LEONI, A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Comp. Pathol.*, v.121, n.3, p.271-276, 1999.
- SANTA ROSA, J., VIEIRA, L. S. *Medidas sanitárias recomendadas para caprinos e ovinos na região nordeste do Brasil*. Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1989. (EMBRAPA-CNPC. Circular técnica, 8).
- SANTIAGO, M.A.M. Resistência a anti-helmínticos. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 2, Fortaleza-CE. *Anais...* Fortaleza: 1980, p. 251-265.
- SARAIVA NETO, A. O. *Soroprevalência da Artrite Encefalite Caprina em plantéis caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco*. Recife - PE: UFPPE Departamento de Medicina Veterinária, 1993. 70p. Dissertação (Mestrado).
- SARAIVA NETO, A.O., CASTRO, R.S., BIRGEL, E.H., NASCIMENTO, S.A. Estudo soro-epidemiológico da artrite-encefalite caprina em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 15, n. 4, p. 121-124, 1995.
- SARGAN, D.R., BENNET, I.D., COUSENS, C., ROY, D.J., BLACKLAWS, B.A., DALZIEL, R.G., WATT, N.J., MCCONNELL, I. Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.*, v. 72, p. 1893-1903, 1991.
- SARGAN, D.R., ROY, D.J., DALZIEL, R.G., WATT, N.J., MCCONNELL, I. A temporal study of RNAs produced in maedi, visna virus infection of choroid plexus cells. *Vet. Microbiol.*, v.39, p. 369-378, 1994.
- SCHADE, K. H. *Light Microscopy: technology and application*. 2.ed. Munchen: Verlag moderne industrie, 1995, 70 p.
- SCHOBORG, R.V., SALTARELLI, M.J., CLEMENTS, J.E. A rev protein is expressed in caprine arthritis encephalitis virus (CAEV)infected cells and is required for efficient viral replication. *Virology*, v.202, p. 1 -15, 1994.
- SCHOPF, K., SCHONBAUER, M. Serological survey of caprine arthritis encephalitis in Tyrol, Austria. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, v.77, n.8, p. 249-52, 1990.
- SCHROEDER, B. A., OLIVER, R. E., CATHCART, A. The development and evolution of end ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus in goat. *N. Zeal. Vet. J.*, v. 33, n. 12, p. 213-219, 1985.
- SERAKIDES, R., NUNES, V.A., PEREIRA, M.F. Estudo clínico, anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAE). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 48, n. 4, p. 415-424, 1996.
- SHIH D.S., CARRUTH, L.M., ANDERSON, M., CLEMENTS, J.E. Involvement of Fos and Jun in the activation of visna virus gene expression in macrophages through an AP-1 site in the viral LTR. *Virology*, v. 190, p.84-91, 1992.
- SIGURDARDÓTTIR, B., THORMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with maedi. *J. Infec. Dis.*, v. 114, n. 1, p. 55-60, 1964.
- SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonie of sheep: an epizootiological and pathological study. *Br. Vet. J.*, v.110, p.225-270, 1954.
- SILVA, M.U.D., SILVA, A.E.D.F. Linfadenite caseosa em caprinos: observações de dois anos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA. 18, 1982. - SC. *Anais...* Camboriú: 1982. p.49-50. (Resumo)
- SILVA, M.U.D., SILVA, A.E.D.F. *Possíveis causas de aborto em caprinos, diagnóstico, tratamento, profilaxia*. Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1983. (EMBRAPA-CNPC. Comunicado técnico, 12).
- SILVA, R. R. *Sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil*. Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba, 1996. 38p. (Monografia, Especialização em Agribusiness).

- SIMARD, C.L., 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. *Can. J. Vet. Res.*, v.54, p.451-456, 1990.
- SIMPLÍCIO, A.A., RIEIRA, G.S., NUNES, J.F. *Puberdade em fêmeas ovinas da raça Somalis*. Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1981. (EMBRAPA-CNPC. Pesquisa em andamento, 4).
- SINGH, S.V., GUPTA, V.K., SINGH, N. Comparative evaluation of a field-based dot-ELISA kit with three other serological tests for the detection of *Brucella* antibodies in goats. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 32, n.3, p.155-163, 2000.
- SMITH, M.C., CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 193, n. 1, p. 63-67, 1988.
- SMITH, M.C., SHERMAN, D.M. *Goat Medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. 620 p.
- SONIGO, P., ALIZON, M., STASKUS, K., KLATZMANN, D., COLE, S., DANOS, O., RETZEL, E., TIOLLAIS, P., HAASE, A., WAIN-HOBSON, S. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, v. 42 p. 369-382, 1985.
- SOTOMAYOR, C., MILCZEWSKI, V. Relato de um rebanho ovino infectado pelo vírus maedi-visna no estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MED. VETERINÁRIA, 25, Gramado-RS. *Anais...* Gramado: 1997. p. 179.
- SOUSA, G.J.G., ALVES, F.S.F., BEZERRA, M.D. Ocorrência da artrite encefalite caprina (CAEV) no estado da Paraíba - inquérito sorológico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1999, Campo Grande-MS. *Anais...* Campo Grande: 1999. CD-ROM.
- SOUZA NETO, J. *Características gerais da caprinocultura leiteira no estado de Pernambuco*. Sobral, EMBRAPA-CNPC, 1987. (EMBRAPA-CNPC. Boletim de Pesquisa, 4).
- SOUZA NETO, J., BAKER, G. A., SOUSA, F. B. Caprinocultura de duplo propósito no Nordeste do Brasil: avaliação do potencial produtivo. *Relatório Técnico do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos 1987-1995*, p. 210-212, 1996.
- STAVROU, D., DEUTSCHLANDER, N., DAHME, E. Granulomatous encephalomyelitis in goats. *J. Comp. Pathol.*, v.79, p.393-396, 1969.
- STEINHAEUER, D.A., HOLLAND, J.J. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 41, p.409-433, 1987.
- STORSET, A.K., TEIG, A., RIMSTAD, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus RNA in macrophages by in situ hybridization using fluorescein-labelled single-stranded RNA probes. *Vet. Microbiol.*, v. 52, p. 25-35, 1996.
- STOTT, D. I. Immunoblotting and dot blotting. *J. Immunol. Methods*, v. 119, p. 153-187, 1989.
- STRINGFELLOW, D.A., SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3. ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. Ed. SBTE, 180p.
- SUMMERS, B.A., CUMMINGS, J.F., de LAHUNTA, A. *Vet. Neuropathol*. Saint Louis: Mosby-Year Book, 1995. 256p.
- SUNDQUIST, B., JONSSON, I., JACOBSON, S.O., HAMMARBERG, K. E. Visna virus leucoencephalomyelitis-arthritis of goats. *Acta Vet. Scand.*, v. 22, p. 315-330, 1981.
- SURMAN, P. G., DANIELS, E., DIXON, B. R. Caprine Arthritis-encephalitis virus infection of goats in South Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 64, p. 266-271, 1987.
- TAVARES, L., PEREIRA, J.M. Importância das infecções por retrovírus da sub-família lentivirinae no homem e nos animais. *Rev. Port. Cien. Vet.*, v. XCIV n. 529, p. 9-27, 1999.
- THRUSFIELD, M. V. *Veterinary Epidemiology*, 2ªEd. Blackwell Science, 1995. 479p.

autumnalis (35,7%), *L. ballum* (21,4%), *L. grippotyphosa* (17,9%), *L. hardjo* (14,3%), *L. sejroe* (7,1%) e *L. pyrogenes* (3,7%) Recentemente, no Estado de Pernambuco, 213 soros foram examinados através da prova de soroprecipitação microscópica, e foi encontrada uma prevalência de 33,3%, sendo os sorovares *L. canícola* com 77,46% e *L. autumnalis* com 36,6%, dentre os 13 sorovares (*autumnalis*, *bratislava*, *canícola*, *castellonis*, *copenhageni*, *djasiman*, *grippotyphosa*, *hardjo*, *ictero-hemorragiae*, *pomona*, *pyrogenes*, *tarassovi*, *wolffi*) utilizados como antígeno, conforme os resultados de Cunha et al. (1999).

Souza Neto et al. (1989), registraram dentro de quatro semanas, nove abortos em uma propriedade em Nova Friburgo – RJ por *Leptospira interrogans* sorovar *Pomona*. Souza (2001), a partir de 286 soros examinados de caprinos do Estado do Rio de Janeiro, registrou 82 com reações positivas, correspondendo a 28,7% do total examinado. Sendo o sorotipo *hardjo* o de maior prevalência, seguido pelo sorotipo *wolffi*.

Em relação à *região serrana* especificamente não se conhecem dados recentes sobre a ocorrência de leptospirose em caprinos.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Material

A *região serrana* está localizada na parte central do Estado do Rio de Janeiro conforme mostra a Figura 1, onde se observa a distribuição das regiões geográficas do Estado do Rio (Produtos..., 1999). A Figura 2 mostra os dez principais municípios da região serrana que estão envolvidos com a caprinocultura leiteira.

Foram selecionados os mais expressivos criatórios, abrangendo 25 rebanhos caprinos da *região serrana* do Estado do Rio de Janeiro, constituídos aproximadamente de 2.624 animais de raças puras e mestiças, conforme dados da EMATER-Rio (Produção..., 1997), destinados à exploração leiteira e, pertencentes aos dez municípios estudados na região serrana do Estado do Rio de Janeiro (Figura 2).

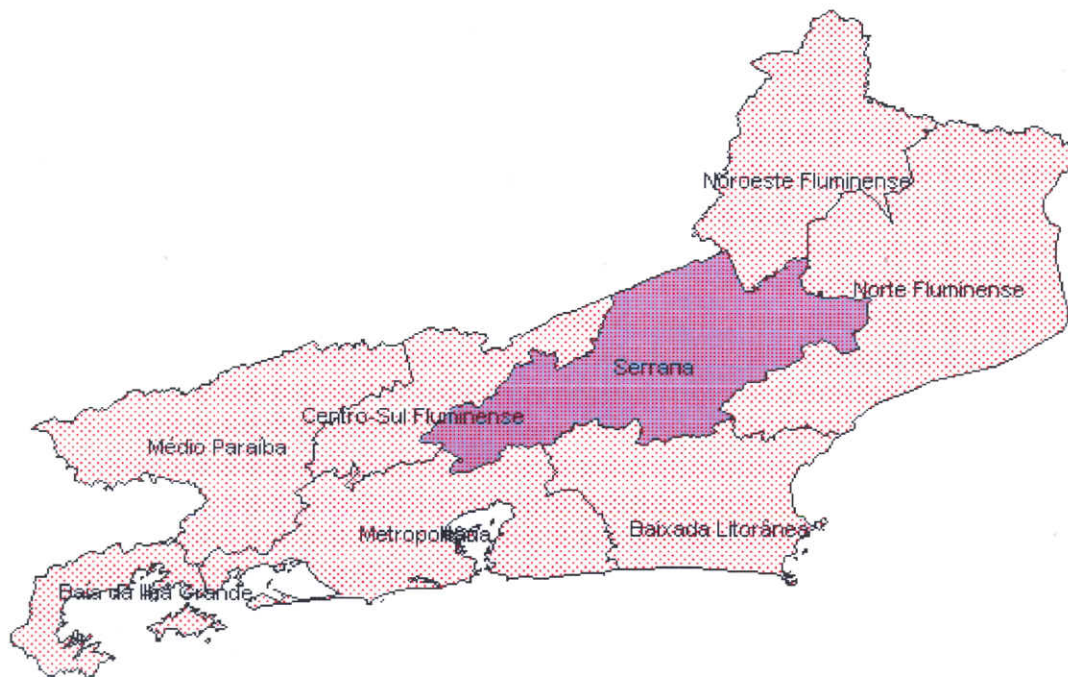


Figura 1 Destaque para a região serrana do Estado do Rio de Janeiro (Produtos..., 1999).

- TINÓCO, A. L. A. *Diagnóstico de situação da ovino/caprinocultura em três municípios do sertão baiano - Euclides da Cunha, Quijingue, Monte Santo - Bahia, 1981/1982*. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, 1983. 13p. (Seminário apresentado no curso de Pós-Graduação - DMVP).
- TONG-STARKSEN, S. E., SEPP, T., SANTOS PAGTAKHAN, A. Activation of Caprine Arthritis-Encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. *J. Virol.*, v. 70, p.595-599, 1996.
- TORFASON, E.G., GUDNADÓTTOR, M., LOVE, A. Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of Visna-Maedi. *Arch. Virol.*, v. 123, p. 47-58, 1992.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.76, p. 4350-4354, 1979.
- TRAVASSOS, C.E., BENOIT, C., VALAS, S., SILVA, A.G., PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Res.*, v. 32, p. 101-106, 1999.
- TYLER, J.W., CULLOR, J.S. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 194, n.11, p. 1550-1558, 1989.
- VALLÉ, H., CARRÉ, H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. *C. R. Acad. Sci.*, v.139, p. 331-333, 1904.
- VAZ de LIMA, L.R., HOSHINO-SHIMIZU, S., de SOUZA, V.A., PANNUTI, C.S., ANDRADE JUNIOR, H.F., SUMITA, L.M., FERREIRA, A.W. Measles serodiagnosis: standardization and evaluation of a Dot-ELISA. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v. 36, n. 2, p.139-147, 1994.
- VERCAMMEN, F., BERKVEN, D., BRANDT, J., VANSTEENKISTE, W. A sensitive and specific 30-min Dot-ELISA for the detection of anti-leishmania antibodies in the dog. *Vet Parasitol.*, n.79, v. 3, p.221-228, 1998.
- VIEIRA, L. S., CAVALCANTE, A. C. R., XIMENDES, L. F. *Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas Regiões semi-áridas do nordeste*. Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1998. 50p.
- 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, J.A., LENSTRA, J.A., HOUWERS, D.J. PCR detection of lentiviral gag segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Commun.*, v.22, p.355-262, 1998.
- WEINHOLD, E. Visna-virus-ähnliche partikel in der kultur von plexus chorioideuszellen einer ziege mit visna-symptomen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B.*, v. 21, p. 32-36, 1974.
- WILSON, M.B., NAKANE, P.K. Conjugation of immunoglobulin with HRP by periodate oxidation. In: KNAPP, W., HOLUBAR, K., WICK, G. *Immunofluorescence and related staining techniques*. Amsterdam: Elsevier, 1978. p.215-232.
- WINWARD, L.D., LEENDERTSEN, L., SHEN, D.T. Microimmunodiffusion test for diagnosis of ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.*, v. 40, n. 4, p. 564-566, 1979.
- WONG, J. K., HEZAREH, M., GUNTARD, H. F., HARLIR, D.V., IGNACIO, C.C., SPINA, C.S., RICHMAN, D.D. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science*, v. 278, p. 1291-1295, 1997.
- WOODARD, J. C., GASKIN, J. M., POULOS, P. W., MACKAY, R. J., BURRIAGE, M. J. Caprine arthritis-encephalitis: clinico-pathologic study. *Am. J. Vet. Res.*, v. 43, n. 12, p. 2085-2096, 1982.
- WRIGHT, P.F., NILSSON, E., VAN ROOIJ, E.M.A., LELENTA, M., JEGGO, M.H.

- Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v. 12, p.435-450, 1993.
- ZANONI, R.G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, v. 79, p. 1951-1961, 1998.
- ZANONI, R., KREIG, A., PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p:580-582, 1989.
- ZANONI, R., PAULI, LT., PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna viruses using polymerase chain reaction. *Experientia*, v. 46, p. 316-319, 1990.
- ZANINI, R.G., VOGT, R., POHL, B., BOTTCHER, W., BOMMELI, W., PETERHANS, E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *J. Vet. Med. B.*, v.41, p. 662-669, 1995.
- ZINK, M.C., JOHNSON, L.K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Res.*, v.32, p. 139-154, 1994.
- ZINK, M.C., NARAYAN, O., KENNEDY, P.G.E., CLEMENTS, J.E. Pathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immun. Immunopathol.*, v.15, p.1671 80, 1987.
- 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. *Am. J. Pathol.*, v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.
- ZWAHLEN, R., AESCHBACHER, M. BALCER, T., STUCKI, M. WYDER-WALTHER, M., WEISS, F., STECK, F. Lentivirus infektionen bei ziegen mit carpites und interstitieller mastitis. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, v.125, p. 281-299, 1983.

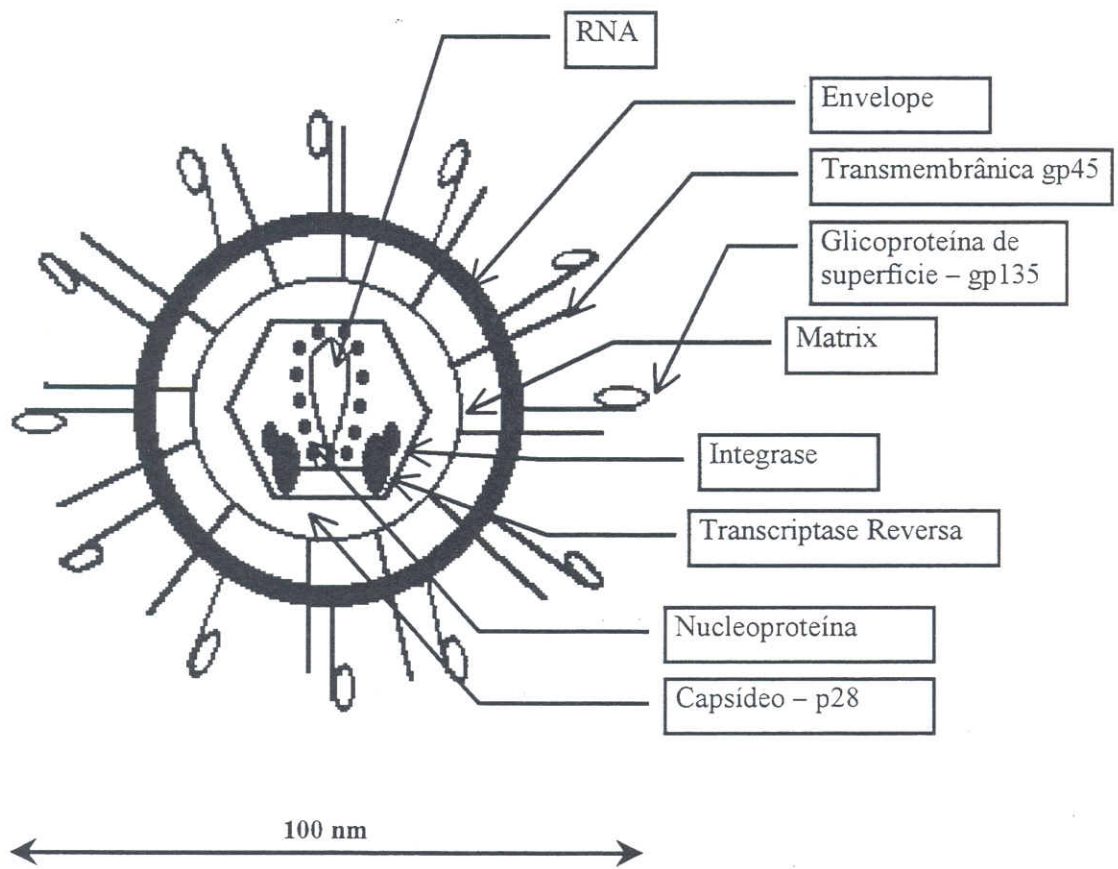
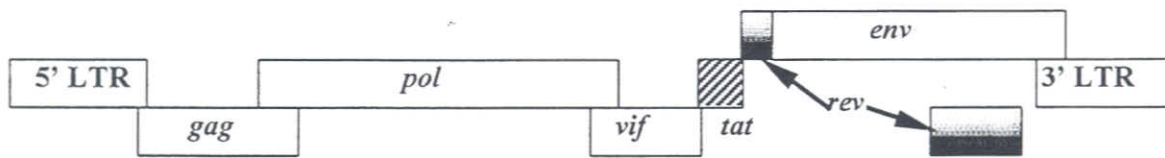


Figura 1 - Estrutura do vírus da artrite encefalite caprina (Coffin, 1996).

Vírus Maedi-Visna (MVV)



Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)

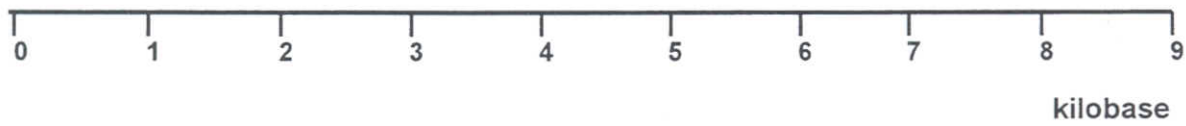
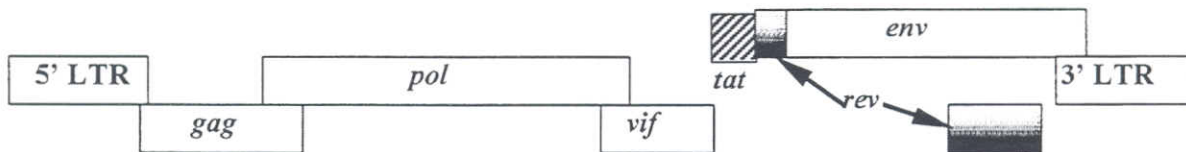


Figura 2- Organização genética dos lentivírus Maedi-Visna e Artrite Encefalite Caprina (Coffin, 1996).

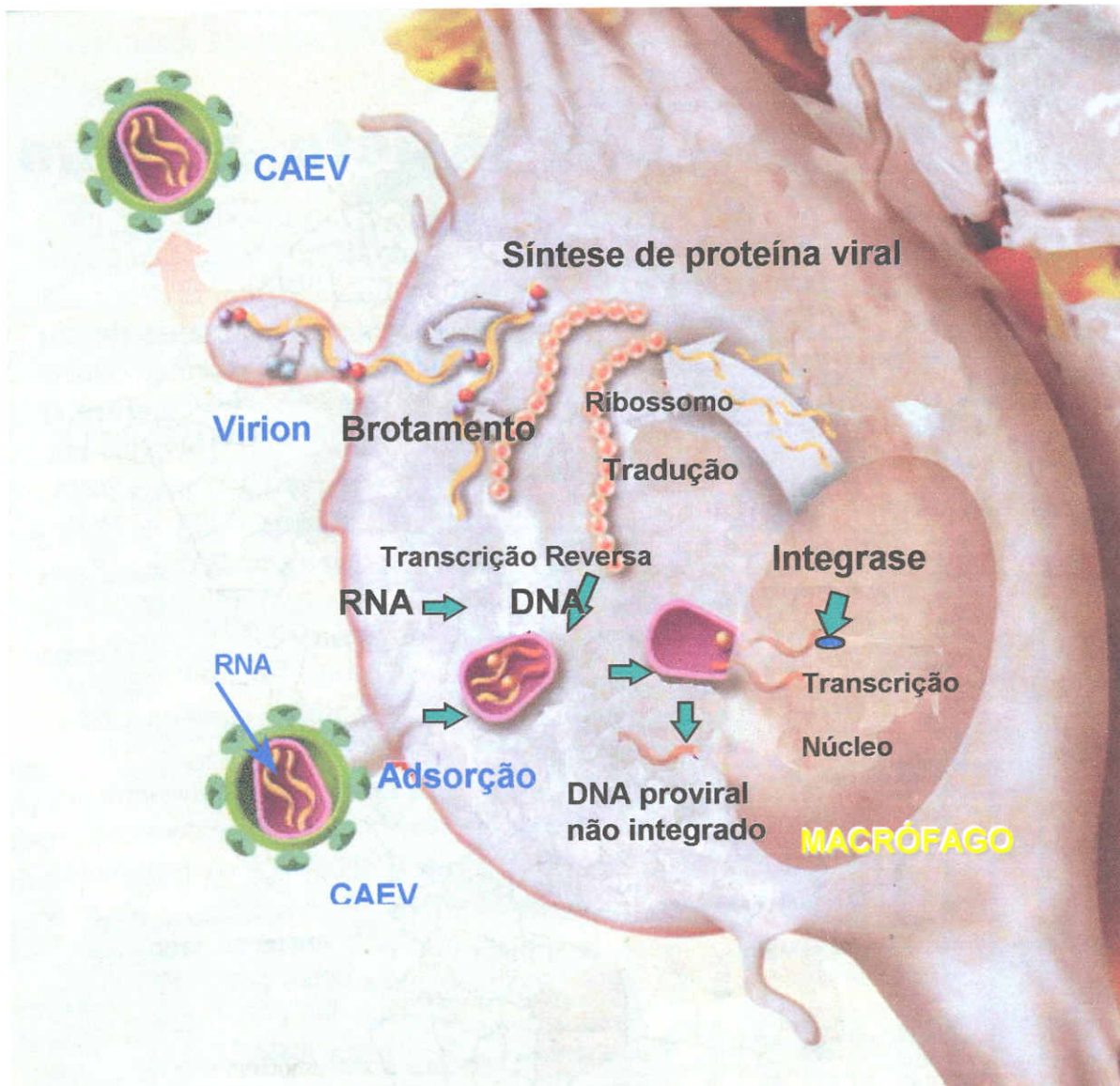


Figura 3 – Ciclo de replicação dos Retrovírus (adaptado de Coffin, 1996).

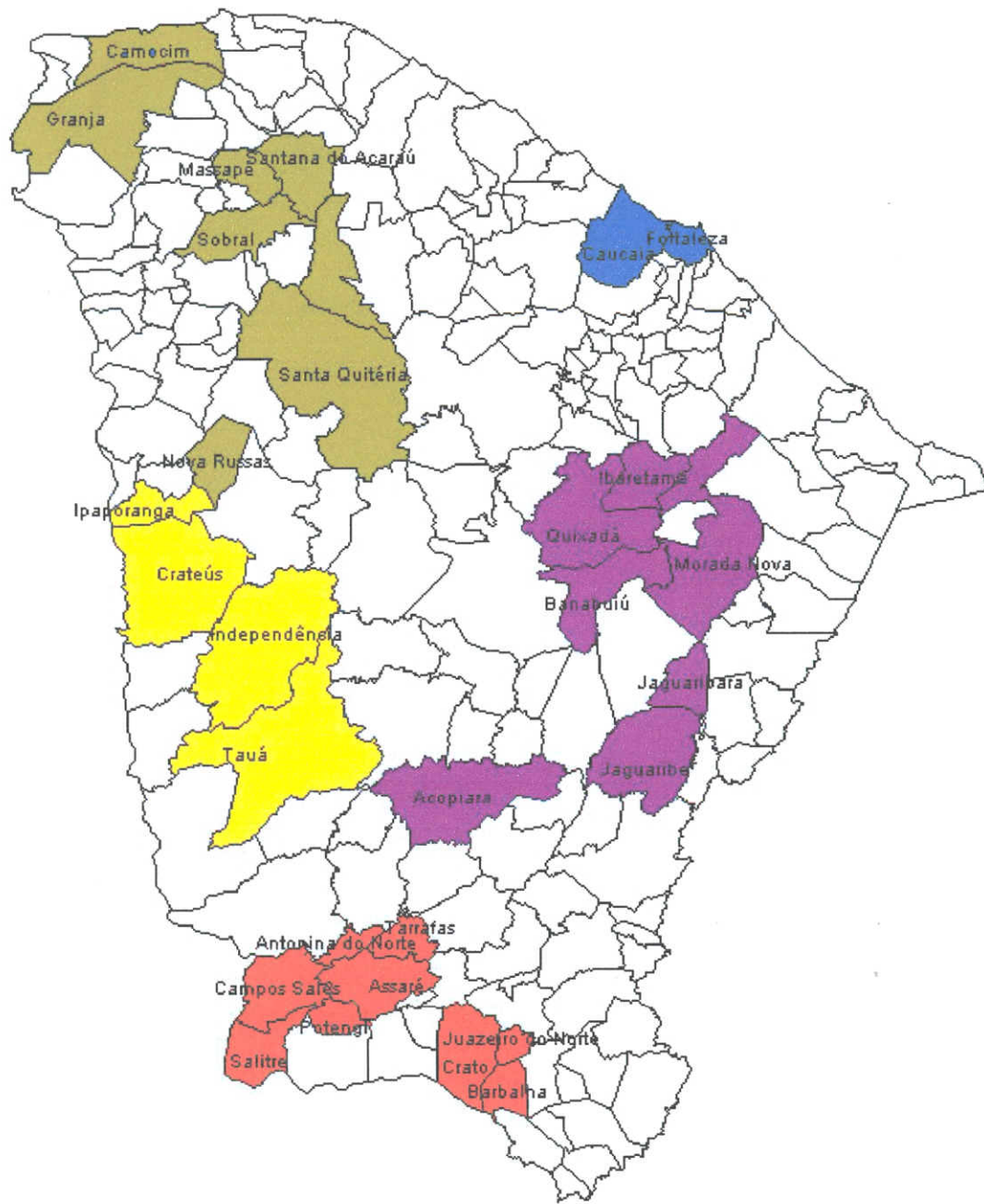


Figura 4 - Municípios do Estado do Ceará segundo as macrorregiões onde foi realizada a pesquisa.

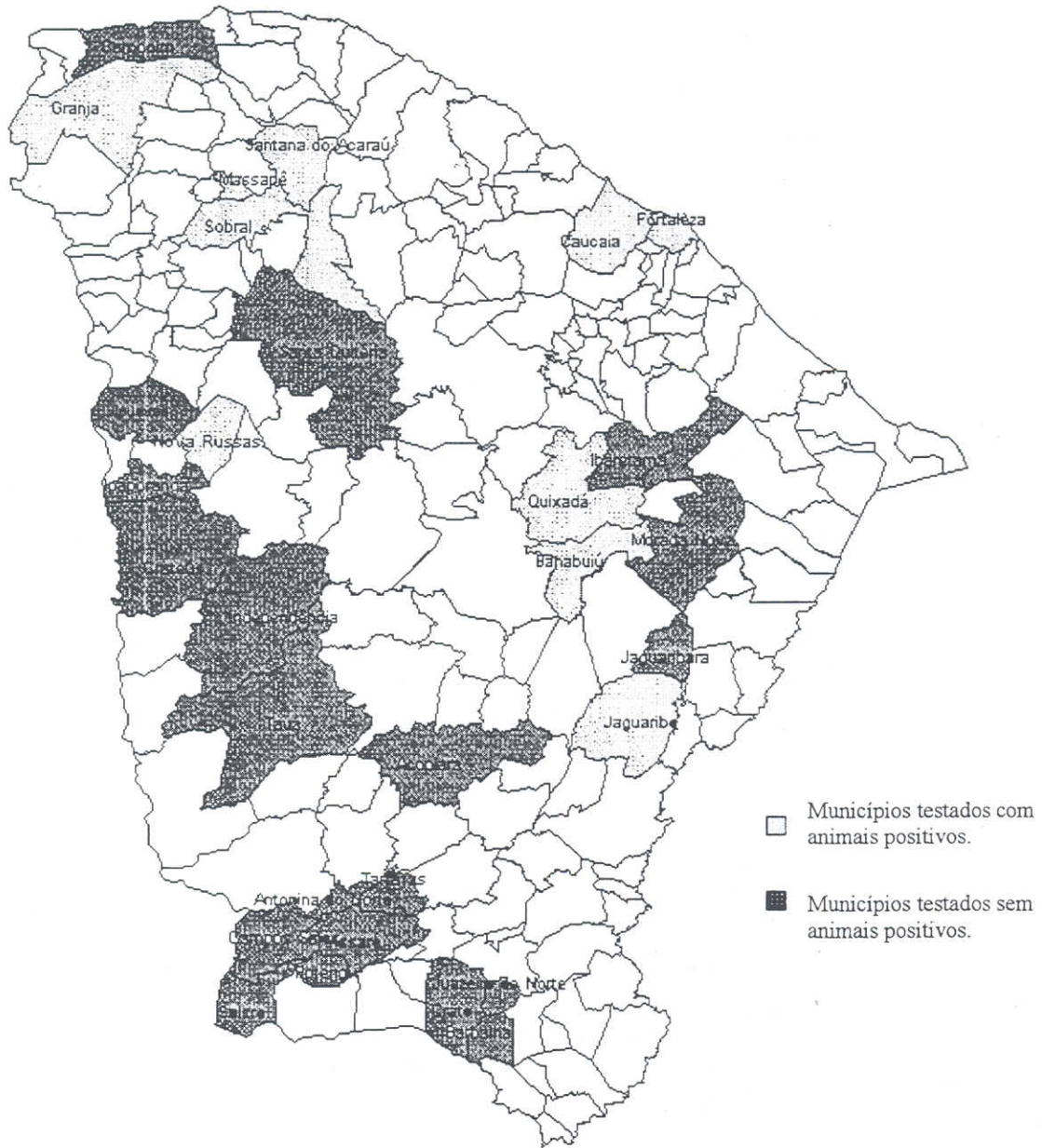


Figura 5 - Municípios do Estado do Ceará onde foi realizada a pesquisa em caprinos para detecção de anticorpos contra CAEV.

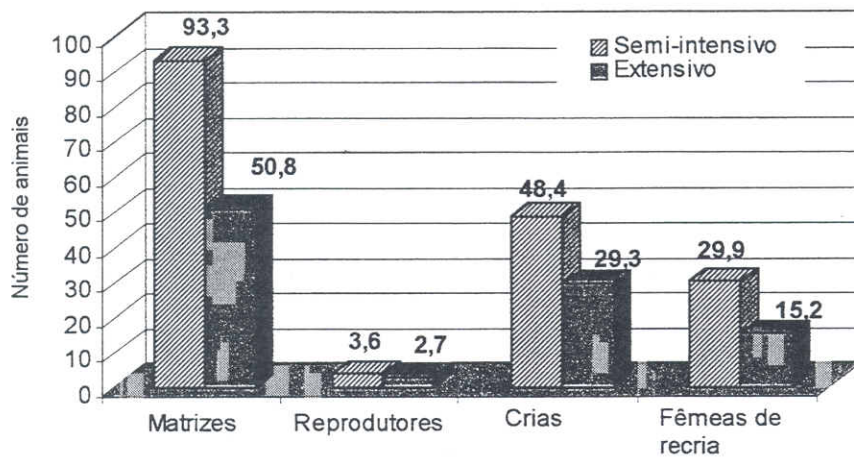


Figura 6 - Número de matrizes, reprodutores, cabritos e novilhas segundo o regime de criação, no Ceará.

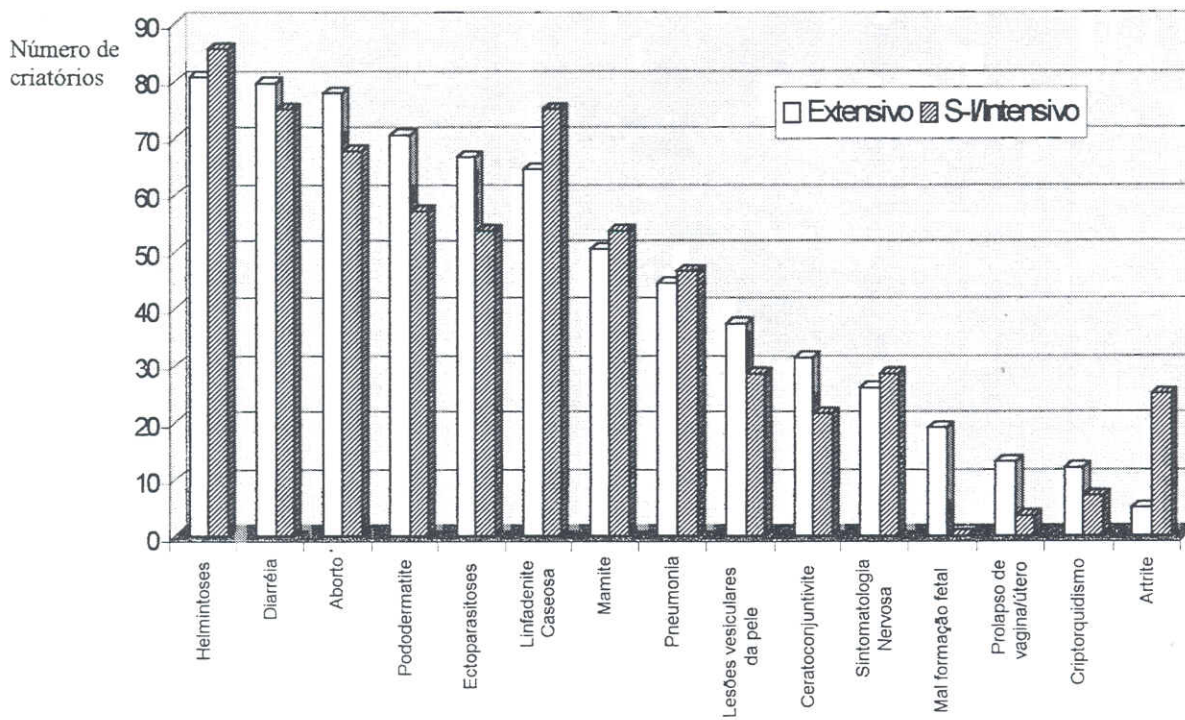


Figura 7 - Sinais clínicos em criatórios caprinos segundo o regime de criação, no Estado do Ceará.

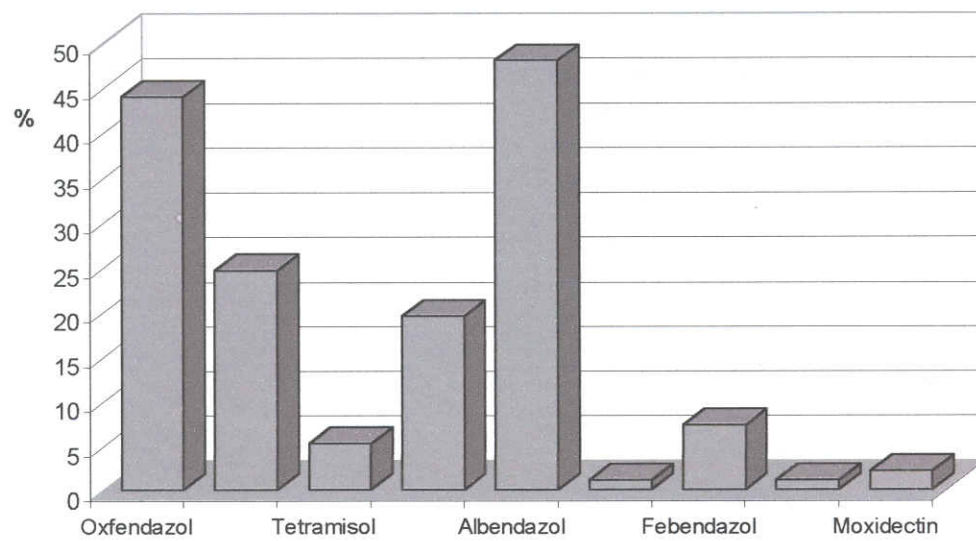


Figura 8- Princípios ativos utilizados em rebanhos caprinos do Estado do Ceará.

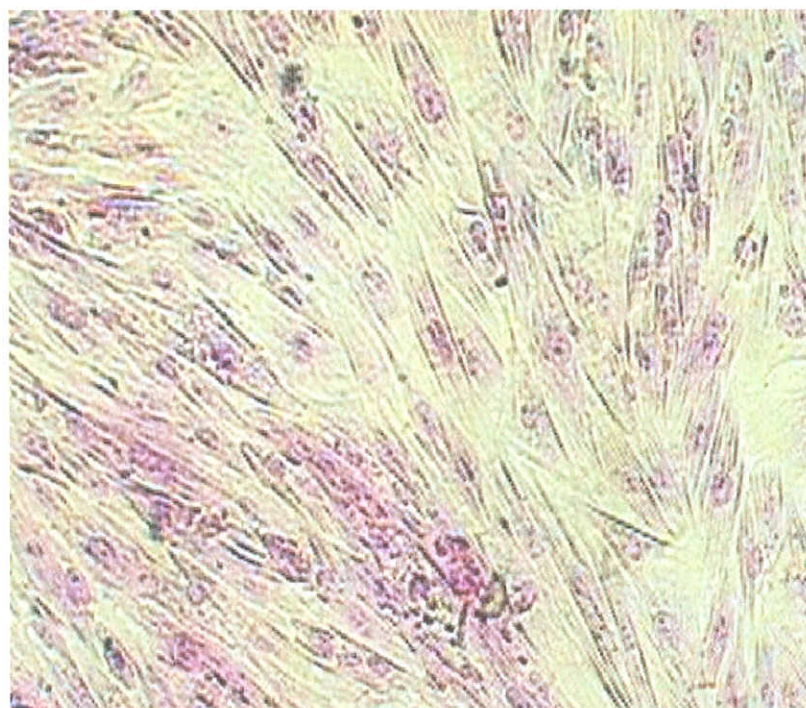


Figura 9 - Células de membrana sinovial caprina não infectada. Aumento de 250 X. Coradas com cristal violeta 0,1%.

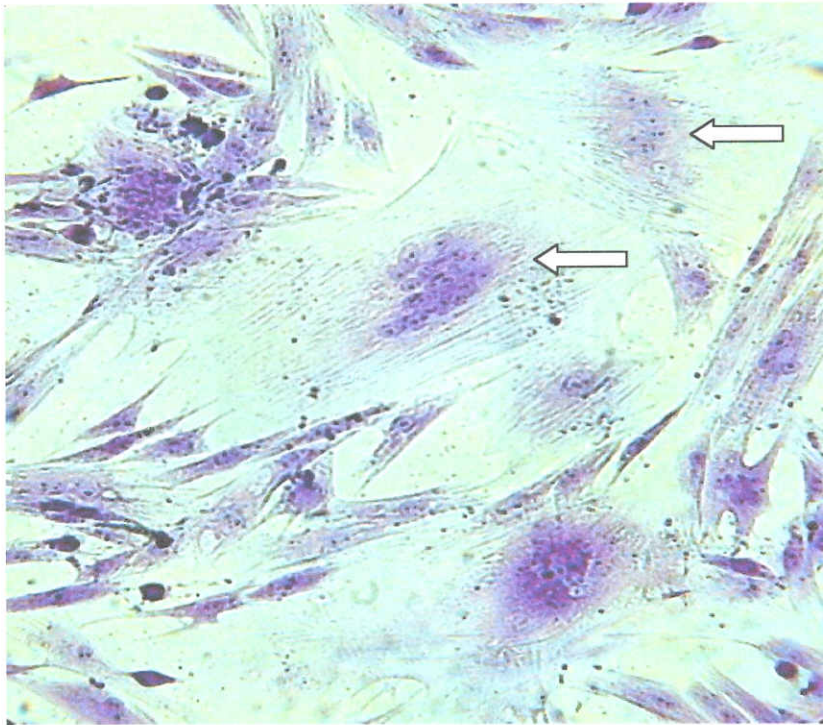


Figura 10 - Células de membrana sinovial caprina infectadas com lentivírus caprino. Presença de células gigantes multinucleadas (setas). Aumento de 200X. Coradas com cristal violeta 0,1%.

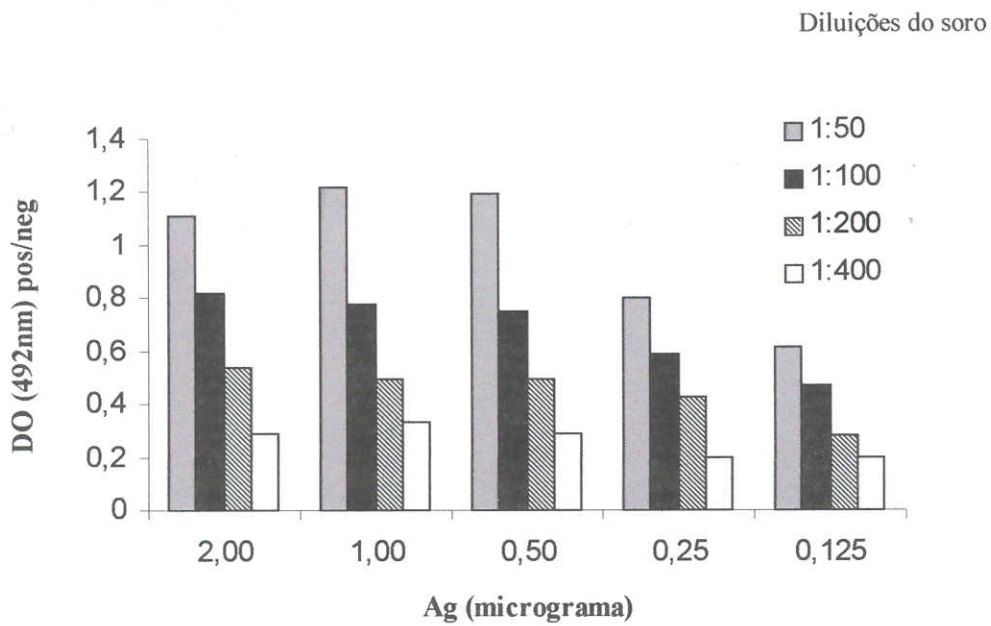


Figura 11- Determinação da quantidade de antígeno e diluição do soro empregado no teste de ELISA-i para o diagnóstico de lentivírus caprino.

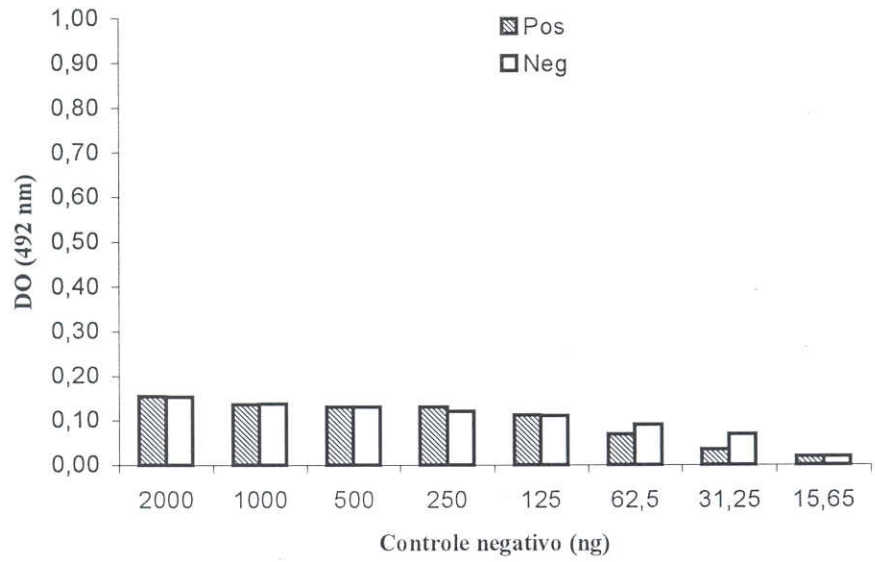


Figura 12 - ELISA do controle negativo, em várias concentrações, frente a soros positivos e negativos.

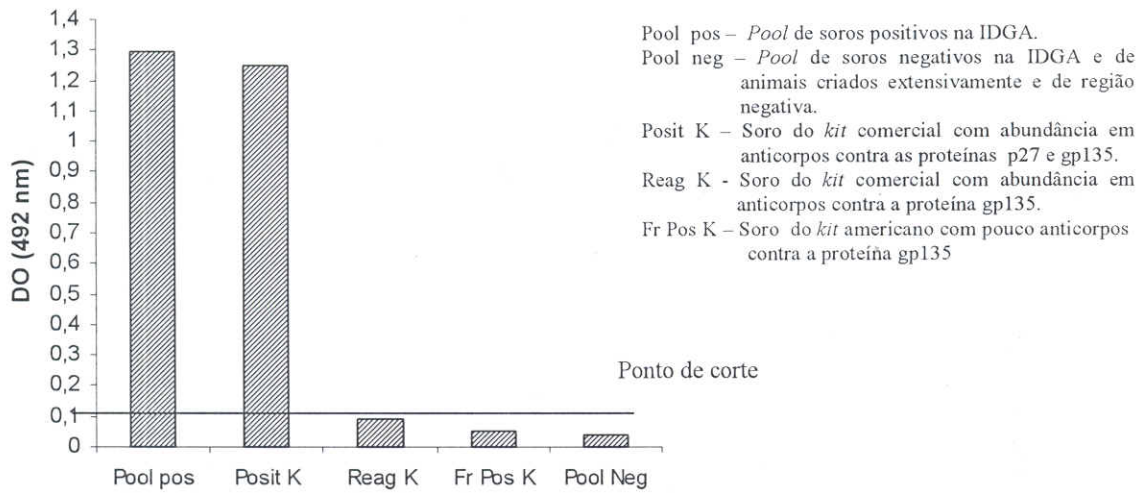


Figura 13 - ELISA do pool de soros positivos, pool de soros negativos e dos soros contidos no kit comercial (positivo, reagente e fraco positivo).

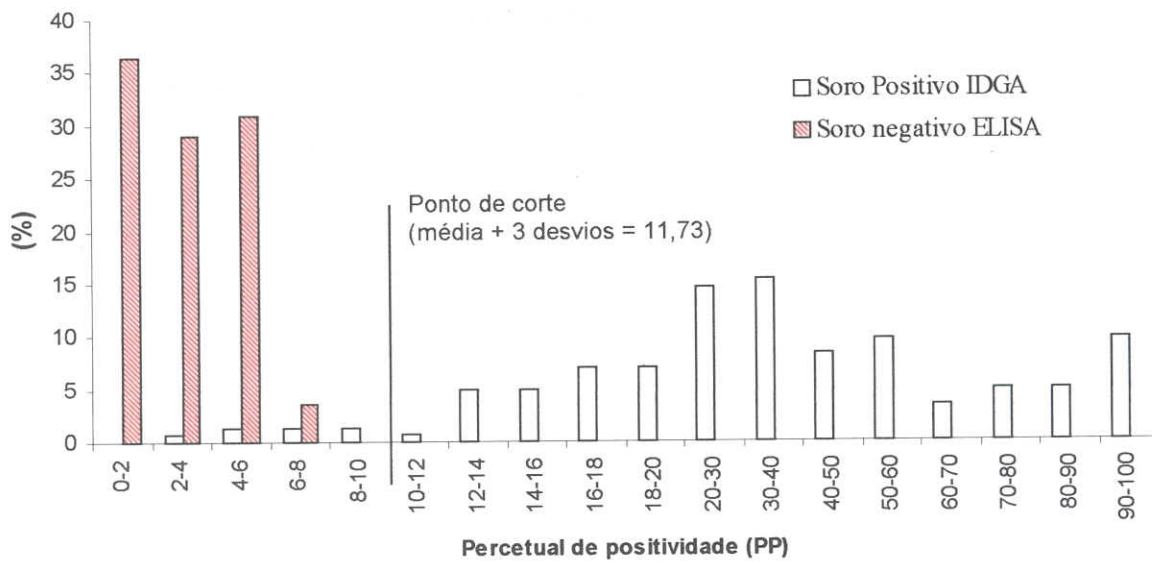


Figura 14 - ELISA - Perfil do percentual de positividade de soros controles negativos e soros positivos pelo IDGA.

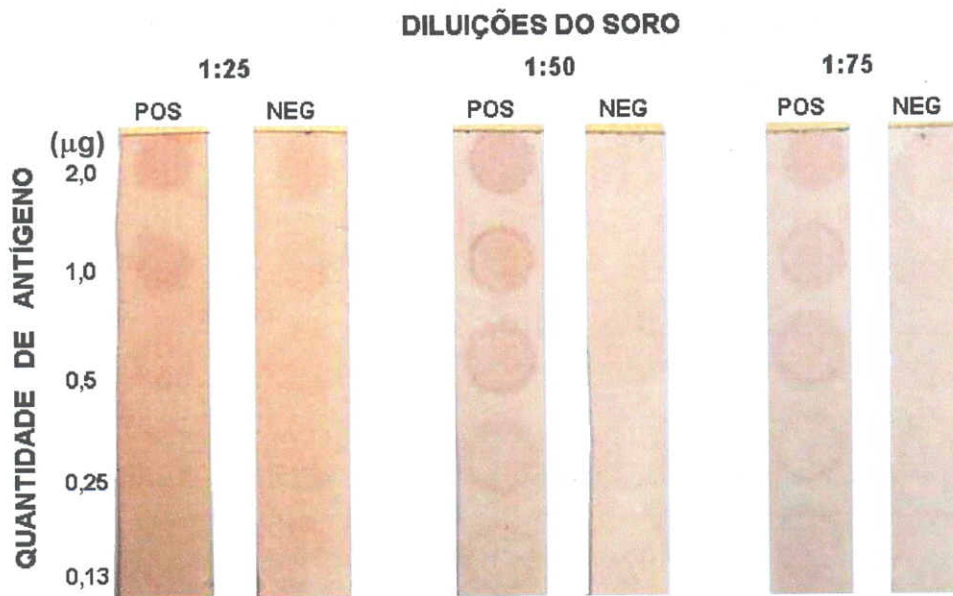
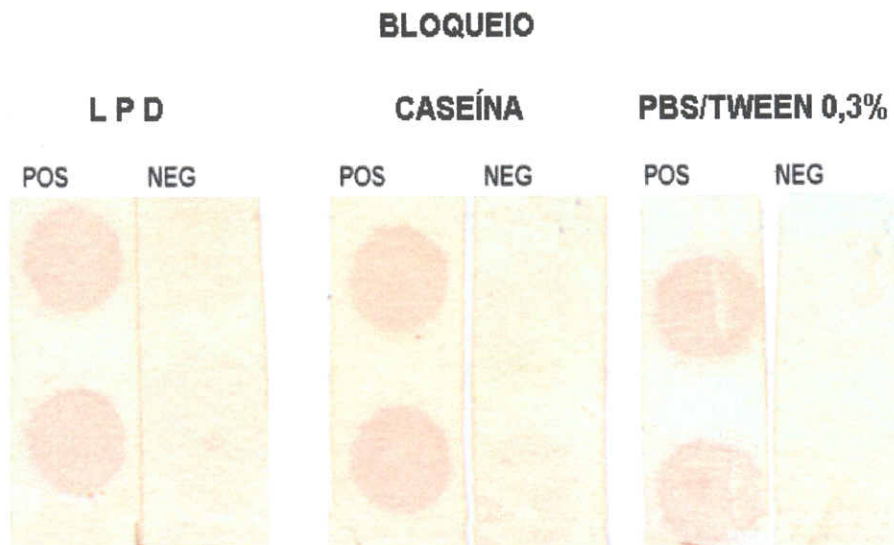
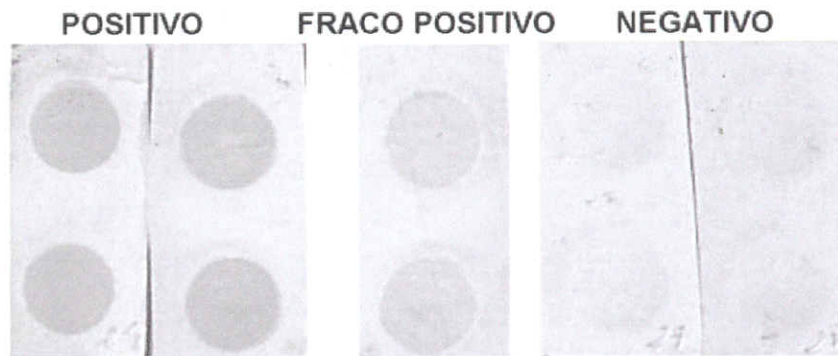


Figura 15- Determinação da diluições do soro frente a cinco diferentes concentração de antígeno utilizado no *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico da infecção por lentivírus caprino.



Concentração de antígeno – 0,5 µg/poço
Diluição do conjugado – 1:500
Diluição do soro – 1:50

Figura 16- Determinação do tipo de bloqueio utilizado no *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico da infecção por LVC.



Quantidade de antígeno – 0,5 µg/poço
Diluição do conjugado – 1:500
Diluição do soro – 1:50

Figura 17- Resultado final do *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico de LVC de um *pool* de soros positivos, fracos positivos e negativos, testados pelo MIDGA.

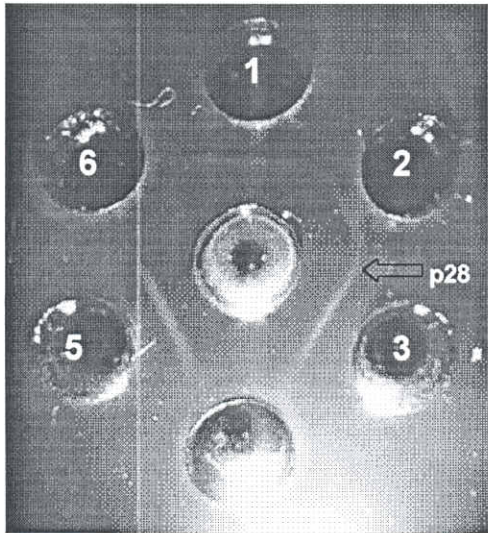


Figura 18 - MIDGA do antígeno AgL1 concentrado 50 X (poço central) frente ao soro positivo do *kit* comercial (poços 1, 2, 3 e 5), negativo (poço 4) e fraco positivo (poço 6). Nos poços 1, 2, 3 e 5 verifica-se a presença de uma linha de precipitação referente a proteína p28.

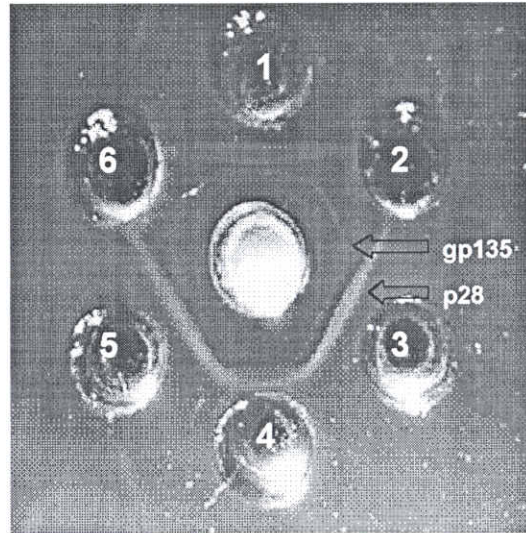


Figura 19 - MIDGA do antígeno AgL1 concentrado 150x (poço central) frente ao soro positivo do *kit* comercial (poços 1, 3, 4 e 5), e reagente nos (poços 2 e 6). Nos poços com soro positivos observa-se claramente a formação de duas linhas de precipitação das proteínas gp135 (interna) e p28.

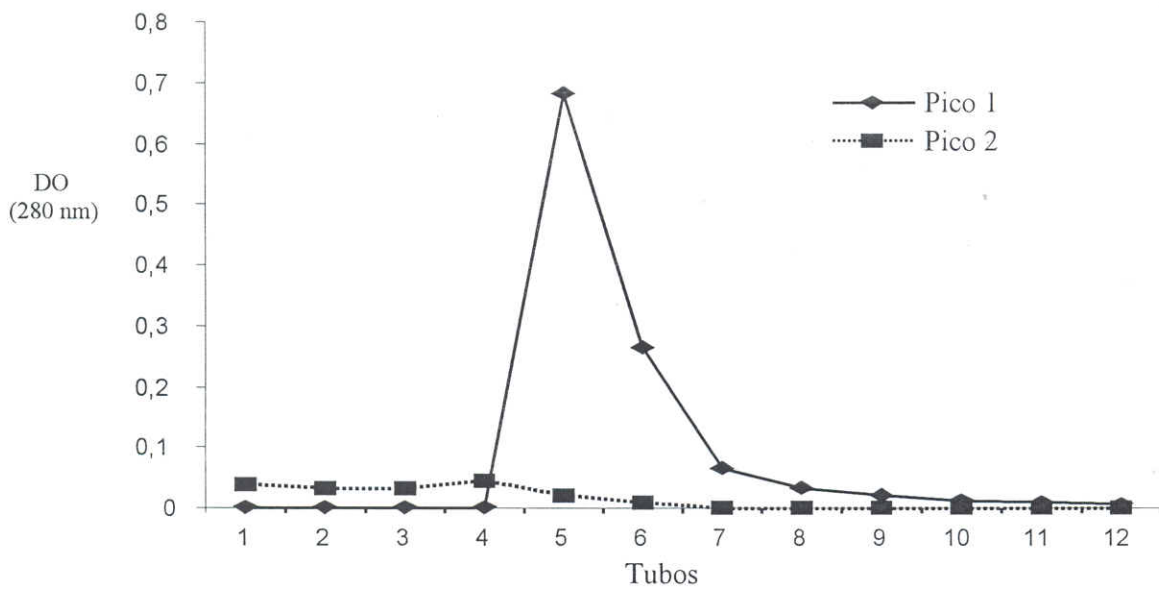


Figura 20 - Picos da coluna de afinidade IgG-LVPR.

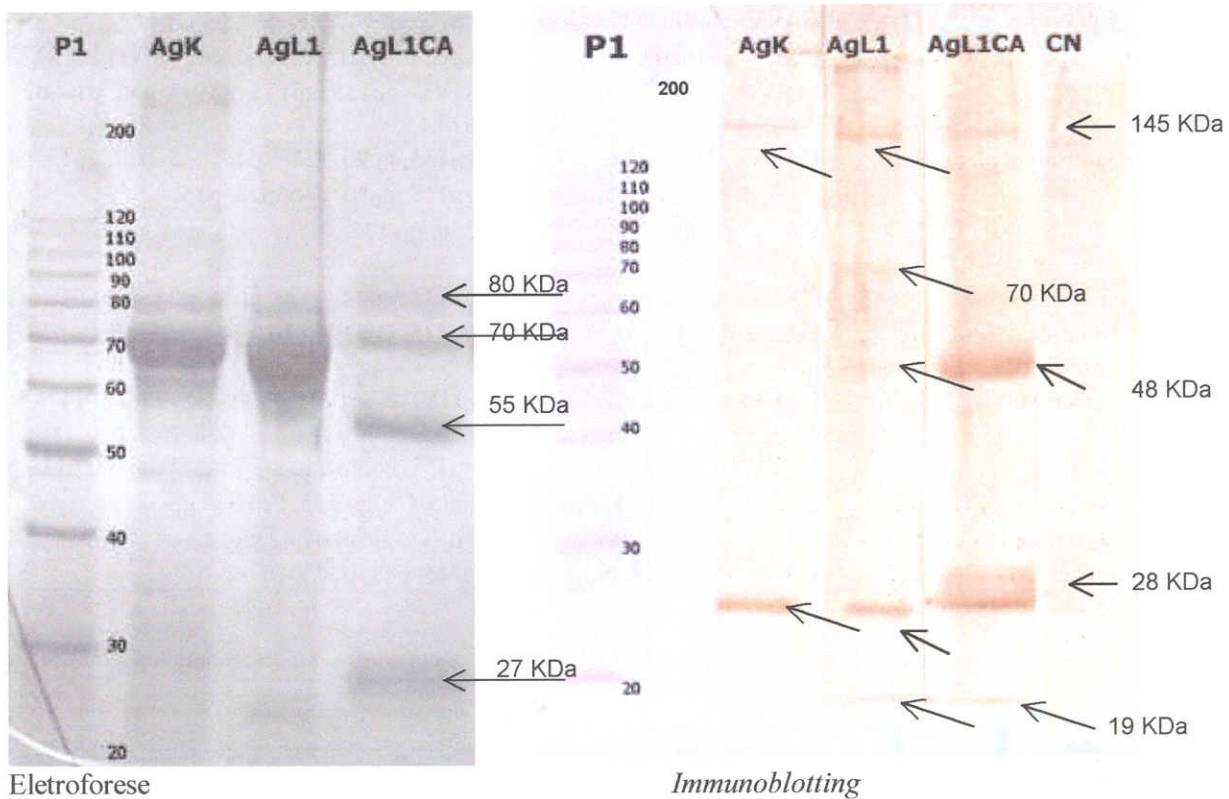


Figura 21 – Comparação, pela eletroforese e *immunoblotting*, do Ag comercial (AgK), antígeno concentrado (AgL₁) e antígeno purificado por afinidade em coluna anti-LVPR (AgL₁CA) e padrão de peso molecular (P1).

Tabela 1 - Polipeptídeos encontrados nos LVPR segundo vários autores.

Autores (ano)	Vírus	Teste	Proteínas encontradas (kDa)
Clements et al. (1980)	CAEV	Imunoprecipitação	gp140, p25, p16,5; p13,5
Cheever et al. (1981)	CAEV	Imunoprecipitação	gp70, gp 48, p28, p20, p16, p14
Dahlberg et al. (1981)	CAEV MVV	Imunoprecipitação	CAEV – gp155, gp140, p63, p51, p28, p17, p14 MVV- gp155, gp135, gp105, p56, p46, p27, p15, p13,5
Johnson et al. (1983)	CAEV	Imunoprecipitação <i>Immunoblotting</i>	gp135, gp90, gp70, p46, p43, p28, gp15, p13 gp125, gp90, p45, p28, p15
Adams et al. (1985)	CAEV	Imunoprecipitação	250, gp 135, 70, 45, p28, p14
Gogolewski et al. (1985)	CAEV	Imunoprecipitação	gp135, gp92, gp70, gp45, p28, p19, p16, p14
Cheever & McGuire (1988)	CAEV		gp135, gp92, gp 70, gp45, p28, p19 e p16
Cheevers et al. (1988a)	CAEV	Imunoprecipitação	Pr150 ^{env} , gp 135, Pr90 ^{env} , Pr55 ^{gag} , Pr47 ^{gag} , 4 polipeptídios entre 30-47k, p28, p16 e p14
Hullinger et al. (1993)	CAEV	Imunoprecipitação	gp135, complexo 90, Pr46 ^{gag} , gp38, p14
Bertoni et al. (1994)	CAEV	Imunoprecipitação	Pr150 ^{env} ; gp 135, Pr47 ^{gag} , gp 38
Davies et al. (1997)	CAEV	<i>Immunoblotting</i>	gp135, gp90, p70, p56, gp45, p32, p19
Pinheiro	CAEV	<i>Immunoblotting</i>	p145, p48, p27, p19

Tabela 2 – Ocorrência inicial da Artrite Encefalite Caprina em vários países, relatados por diversos autores.

País	Ano	Autor	País	Ano	Autor
Alemanha	1986	Heil	Itália	1986	Agrimi et al.
Arábia Saudita	1990	Alluwaimi et al.	Jamaica	1988	Grant et al.
Austrália	1978	O'Sullivan	Kenia	1984	Adams et al.
	1981	Coackley et al.	México	1984	Adams et al.
	1981	Gee		1985	Nazara et al.
	1981	Robinson			
Austria	1990	Schopf & Schonbauer	Nigéria	1984	Belino & Ezeifeke
Canadá	1984	Adams et al.	Noruega	1984	Adams et al.
Costa Rica	1992	Jiménez et al.	Nova Zelândia	1982	Oliver et al.
				1984	Adams et al.
Espanha	1987	Gonzáles et al.	Paises Baixos	1987	Houwens et al.
Estados Unidos	1974	Cork et al.	Peru	1984	Adams et al.
	1984	Adams et al.			
França	1982	Russo	Síria	1992	Giangaspero et al.
	1984	Adams et al.			
Fuji	1984	Adams et al.	Suécia	1981	Sundquist, et al.
Hungria	1986	Pálfi et al.	Suíça	1983	Zwahlen et al.
				1984	Adams et al.
				1993	Loung et al.
Inglaterra	1983	Dawson et al.	Taiwan		
	1984	Adams et al.			
	1984	Dawson & Wilesmith			
Irlanda	1986	Adair	Turquia	1994	Burgu et al.
Israel	1983	Perk & Hod			

Tabela 3 – Ocorrência de caprinos soropositivos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em vários Estados do Brasil, relatados por diversos autores.

Estado	Ocorrência (%)	Fonte
Bahia	-----	Fiterman, 1988
	12,8%	Assis & Gouveia, 1994
	9,2%	Gouveia et al., 1998
Ceará	-----	Pinheiro et al., 1989
	27,5%	Assis & Gouveia, 1994
	40,7%	Melo, 1996
Espírito Santo	47,5%	Gouveia et al., 1998
Goiás	10,0%	Gouveia et al., 1998
Maranhão	50,6%	Alves & Pinheiro, 1997
Minas Gerais	33,3%	Assis & Gouveia, 1994
	23,6%	Gouveia et al., 1998
Pará	40,0%	Ramos et al., 1996
Paraíba	9,0%	Souza et al., 1999
	3,0%	Castro et al., 2000
Paraná	28,2%	Sotomayor e Milczewski, 1997
Pernambuco	17,6%	Saraiva Neto, 1993
	17,7%	Castro et al., 1994
	3,9%	Castro et al., 2000
Piauí	4,4%	Pinheiro et al., 1996
Rio Grande do Sul	6,0%	Moojen et al., 1986
Rio de Janeiro	29,7%	Assis & Gouveia, 1994
	21,0%	Cunha & Nascimento, 1995
	10,6%	Gouveia et al., 1998
	49,0%	Garcia et al., 1992
São Paulo	29,8%	Fernandes, 1997

Tabela 4 – Diagnóstico sorológico da infecção por LVPR por Microimunodifusão em gel de ágar em caprinos nas diversas regiões do Estado do Ceará, 1999.

Região	Número de Fazendas	Reagente		Não Reagente		Total
		Número	%	Número	%	
RMF**	5	23	11,1	185	88,9	208
Norte	39	14	1,0	1422	99,0	1436
Central	38	3	0,3	1018	99,7	1021
Inhamuns	26	0	0,0	735	100,0	735
Sul	22	0	0,0	619	100,0	619
Total	130	40	1,00	3979	99,0	4019

* Kit - *Veterinary Diagnostic Technology, Inc*®.)

** RMF – Região metropolitana de Fortaleza

Tabela 5 – Distribuição, segundo sua procedência, dos caprinos soropositivos para infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Ceará, 1999.

Origem do animal soropositivo	Quantidade	%
Região metropolitana de Fortaleza	22	55,0
Rio de Janeiro	5	12,5
Estados do Nordeste	4	10,0
Outros países	4	10,0
Região de Sobral	3	7,5
Cria da Fazenda	2	5,0
Total	40	100,0

Tabela 6 – Sexo, composição do rebanho, grau de sangue e tipo racial de caprinos negativos e positivos para o CAEV, no Ceará, 1999.

Variável	Estrato	Reagente ¹		Não reagente ¹		Total
		Número	%	Número	%	
Sexo	Macho	14 ^a	2,3	606	97,7	620
	Fêmea	26 ^b	0,8	3373	99,2	3399
Categoria	Reprodutor	12 ^a	3,8	306	96,2	318
	Matriz	25 ^b	0,9	2779	99,1	2804
	Jovem	3 ^b	0,3	894	99,7	897
Grau de sangue	Raças puras leiteiras	37 ^a	4,6	773	95,4	810
	Mestiço	3 ^b	0,1	2302	99,9	2305
	Nativo/SRD	0 ^b	0,0	904	100,0	904
Tipo Racial	Pardo Alpina (PA)	8 ^a	18,6	35	81,4	43
	Saanen (SA)	7 ^b	4,4	151	95,6	158
	Anglo Nubiana	22 ^{bc}	4,0	533	96,0	555
	Mestiço PA x SRD	1 ^{bc}	1,1	94	99,0	95
	Mestiço SA x SRD	2 ^c	1,0	200	99,0	202

¹ MIDGA - Microtécnica de imunodifusão em gel de ágar

^a Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (χ^2 ; p<5%) entre os extratos formados com base no mesmo critério.

Tabela 7 - Número de caprinos por categoria animal nos rebanhos do Ceará.

	Matrizes	Reprodutores	Crias	Fêmeas Recria	Total
Média	59	3	33	19	114
Máximo	900	14	500	100	1514
Mínimo	7	0	2	1	10

Tabela 8 - Distribuição dos rebanhos caprinos no Ceará segundo o tipo de exploração.

Regime de Criação	Total	%
Extensivo	99	77,9
Intensivo	2	1,6
Semi-intensivo	25	19,6
Intensivo/Semi-intensivo	1	0,8
Total	127	100,0

Tabela 9 - Sinais clínicos que, segundo os proprietários, acometem em ordem de frequência os caprinos no Estado do Ceará.

Sinais Clínicos	Presença		Ausência		Não sabe informar	
	Número	%	Número	%	Número	%
Anemia e edema de barbela	104	81,9	19	15,0	4	3,2
Diarréia	100	78,7	24	18,9	3	2,7
Aborto	96	75,6	26	20,5	5	3,9
Pododermatite	86	67,7	35	27,6	6	4,7
Linfadenite	85	66,9	37	29,1	5	3,9
Ectoparasitoses	81	63,8	42	33,1	4	3,2
Mamite	65	51,2	56	44,1	6	4,7
Pneumonia	57	44,9	65	51,2	5	3,9
Lesões vesiculares de pele	45	35,4	77	60,6	5	3,9
Ceratoconjuntivite	37	29,1	85	67,0	5	3,9
Sintomatologia nervosa	33	26,8	89	69,3	5	3,9
Malformação fetal	19	15,0	103	81,1	5	3,9
Criptorquidismo	14	11,0	108	85,0	5	3,9
Prolapso de vagina/útero	14	11,0	108	85,0	5	3,9
Artrite	11	8,7	110	86,6	6	4,7

Tabela 10 - Mortalidade de caprinos jovens e adultos em rebanhos do Estado do Ceará.

Mortalidade		Número	%
Jovem	0 a 10%	47	40,2
	10 a 25%	23	19,6
	Acima de 25%	47	40,2
Adulto	0 a 5%	93	80,2
	5 a 10%	13	11,2
	Acima de 10%	10	8,6

Tabela 11 – Práticas de manejo sanitário utilizadas em 127 criatórios caprinos no Estado do Ceará.

Prática de manejo sanitário	Presença		Ausência		Não sabe informar	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Tratamento do umbigo	47	37,0	76	59,8	4	3,2
Vacina	40	31,5	84	66,1	3	2,4
Corte de casco	21	16,5	103	81,1	3	2,4
Área de isolamento	10	7,9	114	89,8	3	2,4
Higiene na ordenha	6	4,7	121	95,3	0	0,0
Área de quarentenário	3	2,4	121	95,3	3	2,4

Tabela 12 – Frequência da assistência técnica aos criatórios caprinos com respectivos índices médios de mortalidade de caprinos no Ceará.

Frequência	Propriedades n	%	Mortalidade	
			Jovem (%)	Adultos (%)
Diária	6	6,5	10,0	2,0
Semanal	11	11,8	16,5	3,8
Quinzenal	9	9,7	13,8	2,8
Mensal	38	40,9	27,0	6,5
Trimestral	1	1,1	----	----
Semestral	1	1,1	----	----
Anual	5	5,4	31,2	7,5
Eventual	22	23,5	34,0	7,0
Total	93	100,0		

Tabela 13 – Medidas de controle da verminose utilizadas em 127 criatórios caprinos no Ceará.

Medidas de controle	Presença		Ausência		Não sabe informar	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Vermifugação	120	94,5	4	3,12	3	2,4
Alternância vermífugo	84	66,1	39	30,7	4	3,2
Troca de pasto	40	31,5	84	66,1	3	2,4
Vermifuga animal recém-chegado	37	29,1	87	68,5	3	2,4
Confina 12 horas após vermifugado	32	25,2	92	72,4	3	2,4
Descanso de pasto	27	21,3	97	76,4	3	2,4
Separa animais jovens dos adultos	20	15,8	104	81,9	3	2,4
Esterqueira	9	7,1	115	90,6	3	2,4

Tabela 14 – Determinação do ponto de corte do ELISA-i para diagnóstico de lentivírus caprino.

	DO*	PP**
Média	0,038	3,370%
Desvio padrão (s)	0,036	2,782
Media + 3 s	0,146	11,73%

* Densidade ótica (492 nm)

** Percentual de positividade

Tabela 15 – Resultados de 327 amostras de soro caprino pelos testes IDGA e ELISA-i para o diagnóstico de anticorpos contra lentivírus caprino.

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA	144	44,0	183	56,0	327
Elisa Indireto*	209	63,9	118	36,1	327

* Positivo (DO > 11,72% em relação ao padrão positivo)

Negativo (DO < 11,72% em relação ao padrão positivo)

Tabela 16 – Comparação dos resultados de soros caprinos testados pela IDGA e pelo ELISA-i para a detecção de anticorpos contra LVPR.

		ELISA		
		Pos	Neg	Total
IDGA	Pos	137	7	144
	Neg	72	111	183
Total		209	118	327

Tabela 17- Resultado do teste de soros caprinos pelo IDGA, ELISA-i e *Dot-Blot* para o diagnóstico da infecção por LVPR.

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA AgK	144	44,04	183	55,96	327
<i>Dot-Blot</i>	200	61,16	127	38,84	327
Elisa Ind*	209	63,91	118	36,09	327

* Positivo (DO > 11,72% em relação ao padrão positivo -pp)
Negativo (DO < 11,72% do pp)

Tabela 18- Comparação dos resultados de soros caprinos testados pelo *Dot-Blot* e pelo ELISA-i para a detecção de anticorpos contra LVPR.

		Elisa-i ^a		
		Pos	Neg	Total
<i>Dot-Blot</i>	Pos	19	9	200
	Neg	1	109	127
	Total	20	118	327

^a - Positivo (DO > 11,7% em relação ao padrão positivo)
Negativo (DO ≤ 11,7% do pp)

Tabela 19 - Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), eficiência (Efic), índice Kappa e qui-quadrado (χ^2) para IDGA e *Dot-Blot* em relação ao ELISA-i de 327 amostras de soro caprino.

Teste	Sens	Espec	VPP	VPN	Efic	Kappa	χ^2 *
IDGA AgA	65,6	94,1	95,1	60,7	75,8	0,53	138,16 (p < 0,001)
DOTBLOT	91,4	92,4	95,5	85,8	91,7	0,83	102,53 (p < 0,001)

* - Qui-quadrado com correção de Yates

Anexo 2 – Questionário Geral

Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária
 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa
 Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos - CNPC
 Projeto Levantamento Epidemiológico da CAEV

FICHA Nº _____

IDENTIFICAÇÃO

Nome do proprietário: _____

Nome da fazenda: _____

Município: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Nome do(s) manejador(es): _____

Data: ____/____/____

REBANHO

Identificação do Rebanho: () Brinco; () Tatuagem; () Corte de orelha; () Medalha; () Outro:

Tipo de exploração: () carne; () leite; () pele; () mista
 () intensiva; () semi-intensiva; () extensiva.
 () caprinos () caprinos e ovinos () cap + ov + ? _____
 () agricultura : _____

Origem do rebanho caprino: _____

Número de animais no rebanho: bovino: _____ equídeo: _____

Tipo de animal:

Tipo de Animal	Número		
	Caprino	Ovino	Total
Matriz			
Reprodutor			
Cabrito / Cordeiro			
Cabrita / Cordeira			
Rufião			
Marrã de ovelha ou Novilha de cabra			
Total			

Tipo racial:

Caprino	Nº	Ovino	Nº
Canidé		Santa Inês	
Marota		Somalis Brasileira	
Moxotó		Morada Nova	
Repartida		Crioula	
SRD		Rabo Largo	
Anglo-nubiana		Bergamácia	
Buhj		SRD	
Mambrina		Mestiços _____ x _____	
Toggenburg		Outros	
Parda Alpina			
Saenen			
Mestiços _____ x _____			
Outras:			
Total			

FAZENDA:

Área: _____

Fonte d'água: () açude-capac: _____ n° _____ () poço profundo-capac: _____ n° _____

() cacimba-capac: _____ n° _____ () caçimbão-capac: _____ n° _____

() outra: _____

Tipo do terreno: () plano () alagado () acidentado

Apriscos: número: _____

tipo: () suspenso; () térreo

área coberta: _____

solários: _____

n° baias: _____ área da baía _____

taxa animal/baía: _____

tipo de piso do aprisco: () chão batido; () ripado; () cimentado; () outros

bebedouro (tipo; localização; tamanho): _____

comedouros: (tipo; localização; tamanho): _____

cocho p/ sal: _____

limpeza: (material utilizado e frequência): _____

Brete: (tipo; capacidade): _____

Sala de ordenha: _____

Sala de processamento de leite (tipo; tamanho; equipamentos, etc): _____

Capineira área: _____ tipo de capim: _____

Banco de proteína: área: _____ tipo de leguminosa: _____

Acompanhamento técnico: (quem/freq) _____

MANEJO ALIMENTAR

Concentrado - formulação: _____

administração: _____

Silagem - formulação: _____

administração: _____

Mineralização: _____

sal mineral- marca: _____

Período: seco: _____

chuvoso: _____

Manipulação da vegetação lenhosa:

Caatinga nativa () Caatinga raleada () Caatinga raleada-rebaixada ()

Caatinga desmatada () Caatinga rebaixada () Caatinga enriquecida ()

MANEJO SANITÁRIO

Mortalidade(%): jovens (até 12 meses)- _____

adultos- _____

Mortalidade por categorias

Tipo de Animal	Número		
	Caprino	Ovino	Total
Matriz			
Reprodutor			
Cabrito / Cordeiro			
Cabrira / Cordeira			
Rufião			
Marrã de ovelha ou Novilha de cabra			
Total			

ENFERMIDADES- frequência e época do ano:

Helmintoses - _____

Diaréias - _____

Ectoparasitas - _____

- Bicheira- _____

Febre aftosa - _____

Linfadenite caseosa (mal do caroço)- _____

Raiva- _____

Artrites - _____

Pneumonias - _____

Ceratoconjuntivite - _____

Mamite - _____

Pododermatite (mal do casco)- _____

Ectima contagioso(boqueira)- _____

Mal formação (prognatismo, agnatismo, hipoplasia): _____

Criptorquidismo- _____

Aborto- _____

Prolapso vaginal/retal- _____

Sintomatologia Nervosa - _____

Vermifugação:

vermifugação estratégica ()

frequência: _____ produto utilizado: _____

alternância de produtos: () sim; () não. Periodicidade: _____

práticas utilizadas:

- troca de pasto após a vermifugação () - troca anual do vermífugo ()

- permanência mínima de 12 h após a vermifugação () - esterqueiras ()

-descanso de pastagens () - separa os animais jovens dos adultos ()

- vermifuga os animais recém-chegados a propriedade ()

Vacinas - tipo: _____ frequência de aplicação: _____

- tipo: _____ frequência de aplicação: _____

Corte de cascos: () frequência: _____

Isolamento () área: _____ área coberta: _____

Quarentenário () área: _____ área coberta: _____

MANEJO REPRODUTIVO

Estação de monta: n° _____ Período _____

n° animais _____

Peso na cobrição: _____

Idade na cobrição: _____

N° de parto p/ ano: _____

Partos simples: _____

Partos duplos: _____

Partos trípos ou mais: _____

Fertilidade ao parto:(n° de fêmeas paridas/n° de fêm. expostas):

Prolificidade (n° crias ao parto) _____

N° reprodutores/fêmeas- _____

Troca de reprodutores () _____ freq. _____

I. A. () : _____ T. E. () : _____

Castração () : idade: _____ modo: _____

Rufiões. Tipo _____ número de fêmeas/ rufião _____

Taxa de natalidade: _____

Descarte de animais (n°/critérios/frequência): _____

MANEJO DAS GESTANTES / RECÉM-PARIDAS E CRIAS

Separa as fêmeas no último 1/3 da gestação ()

Maternidade () área total: _____ área coberta: _____

Alimentação extra gestante: _____
recém-parida: _____

Crias

Controle de nascimento(identificação de pai/mãe/peso e tipo de parto): ()

Colostro:

colostro artificial: _____

administração do colostro: _____

banco de colostro: _____

Corte e Cura do umbigo(quanto, como e produto): _____

Limpeza da cria: _____

Local apropriado: _____

Aleitamento: () natural; () artificial: leite: cabra (); vaca; () em pó vaca; () em pó soja
() outro: _____

Amoção: () não; () sim: ferro quente (); química ()

PRODUÇÃO DE LEITE:

Nº de fêmeas em lactação: _____

Produção láctea (pico) grupo: _____ individual: _____

Higiene da ordenha:

Higienização da sala e/ou equip. (freq. / produto): _____

Linha de ordenha: () _____

Limpeza da mãos e úbere (): _____

Imersão das tetas em desinfetante após a ordenha: _____

Tipo de desinfetante: _____

Tratamento preventivo de mamites em cabras secas: _____

Secagem de cabras (dias pré-parto): _____

Armazenamento do leite: _____

Anexo 3

Custo de produção dos antígenos e dos testes (IDGA, ELISA e Dot-Blot)

Para este cálculo levou-se em conta custos diretos (fixos e variáveis) e indiretos (fixos e variáveis). Os valores foram cotados em dólares ou reais por várias fontes e convertidos para dólar americano (1 dólar = 1,82 reais cotação obtida no dia 24/08/00). Como uma referência citou-se o preço F.O.B. do kit americano para o diagnóstico da MVV/CAEV¹ de US\$ 85.00. Os custos diretos fixos foram compostos por todo o material de laboratório ou não usado diretamente no projeto, juntamente com a mão de obra direta e encargos. Todas as etapas foram detalhadamente calculadas. Na mão de obra foi incluído o tempo médio de passagem, troca de meio e inoculação viral de garrafas de acordo com o número e o tipo destas. Todos os componentes, reagentes e meios utilizados foram dimensionados e calculado o gasto proporcionalmente. Quanto aos custos diretos variáveis computou-se a utilização de material laboratorial reutilizável (vidraria e plásticos), equipamentos, energia direta e material de lavagem. O custo de quebra da vidraria, seja na manipulação direta no projeto, seja na lavagem foi inserido no desgaste calculado no custo direto variável. Com relação aos equipamentos o gasto foi elaborado com base no preço do equipamento novo, vida útil deste e desgaste e depreciação tecnológica por ano. A vida útil do equipamento foi considerada com uma carga de trabalho diária de 8 horas e o gasto pelo percentual de uso do equipamento com relação às horas trabalhadas. Ex. geladeira usada todo o tempo com somente 10% de sua capacidade interna.

Desgaste e depreciação tecnológica p/ano = $\frac{\text{valor do equipamento ou material novo} - \text{valor de sucata (0 - 20\%)}}{\text{Vida útil}}$

Desgaste de uso direto = percentual de uso do equipamento no momento da utilização x desgaste e depreciação tecnológica/ano

Com relação aos custos indiretos fixos (administração do laboratório, instalações laboratoriais, transformador de energia, mão de obra indireta) convém salientar que no momento da realização deste trabalho as instalações laboratoriais eram utilizadas em vários projetos conjuntamente e a utilização direta para o projeto estimou-se em torno de 10% durante o período de um ano. Os custos indiretos variáveis (energia, luz, ar condicionado, água) utilizados no projeto também foram estimados em 10% do consumo durante um ano. Calculou-se, então, que os custos indiretos incidiam em torno de 10% dos custos diretos sendo 3% referente aos custos indiretos fixos e 7% para os custos indiretos variáveis.

¹ *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®*

Composição do custo para produção de 13 ml de antígeno ELISA/Dot-Blot concentrado 180x	
	Preço US\$
CUSTO DIRETO FIXO	
INSUMOS - Material de laboratório	550.32
Mão de obra direta	259.43
CUSTO DIRETO VARIÁVEL	
Material de laboratório	18.85
Equipamentos	124.10
Energia	36.20
Material de Lavagem	13.36
CUSTO DIRETO TOTAL	1002.26
CUSTO INDIRETO FIXO (3% do total dos custos diretos)	30.07
Instalações laboratoriais (10% utilização no projeto)	
Serviço de limpeza	
Instalações elétricas e hidráulicas	
CUSTO INDIRETO VARIÁVEL (7% do total dos custos diretos)	70.16
Outros (Iluminação,Taxas água/esgoto, Administração, etc)	
CUSTO INDIRETO TOTAL	100.23
CUSTO TOTAL	1102.49
Produção por lote (mL)	13
Custo/mL de Antígeno	84.81

Composição do custo para produção de 46,5 mL de antígeno IDGA CONCENTRADO 50X	
	Preço US\$
CUSTO DIRETO FIXO	
INSUMOS - Material de laboratório	534.99
Mão de obra direta	272.06
CUSTO DIRETO VARIÁVEL	
Material de laboratório	10.39
Equipamentos	122.79
Energia	35.80
Material de Lavagem	17.16
CUSTO DIRETO TOTAL	993.19
CUSTO INDIRETO FIXO (3% do total dos custos diretos)	29.80
Instalações laboratoriais (10% utilização no projeto)	
Serviço de limpeza	
Instalações elétricas e hidráulicas	
CUSTO INDIRETO VARIÁVEL (7% do total dos custos diretos)	69.52
Outros (Iluminação,Taxas água/esgoto, Administração, etc)	
CUSTO INDIRETO TOTAL	99.32
CUSTO TOTAL	1092.51
Produção por lote (mL)	46.5
Custo/mL de Antígeno	23.49

Composição do custo do teste MIDGA (12 lâminas - 1 ml de antígeno)	
	Preço US\$
CUSTO DIRETO FIXO	
INSUMOS - Material de laboratório	34.92
Mão de obra direta	25.25
CUSTO DIRETO VARIÁVEL	
Material de laboratório	4.12
Equipamentos	1.35
Energia	0.42
Material de Lavagem	1.80
CUSTO DIRETO TOTAL	67.85
CUSTO INDIRETO FIXO (3% do total dos custos diretos)	
Instalações laboratoriais (10% utilização no projeto)	2.04
Serviço de limpeza	
Instalações elétricas e hidráulicas	
CUSTO INDIRETO VARIÁVEL (7% do total dos custos diretos)	
Outros (Iluminação, Taxas água/esgoto, Administração, etc)	4.75
CUSTO INDIRETO TOTAL	6.78
Custo do teste MIDGA (US\$)	
custo total = 112 testes	74.63
custo do teste amostral em duplicata	0.67

COMPOSIÇÃO DO CUSTO DO TESTE ELISA-I / PLACA	
	Preço US\$
CUSTO DIRETO FIXO	
INSUMOS - Material de laboratório	14.86
Mão de obra direta	22.50
CUSTO DIRETO VARIÁVEL	
Material de laboratório	3.75
Equipamentos	2.22
Energia	0.94
Material de Lavagem	2.17
CUSTO DIRETO TOTAL	46.44
CUSTO INDIRETO FIXO (3% do total dos custos diretos)	
Instalações laboratoriais (10% utilização no projeto)	1.39
Serviço de limpeza	
Instalações elétricas e hidráulicas	
CUSTO INDIRETO VARIÁVEL (7% do total dos custos diretos)	
Outros (Iluminação, Taxas água/esgoto, Administração, etc)	3.25
CUSTO INDIRETO TOTAL	4.64
Custo do ELISA-i (US\$)	
custo total = 42 testes	51.08
custo do teste amostral em duplicata	1.22

Composição do custo do teste *Dot-Blot/Slot blot* c/ 96 poços

	Preço US\$
CUSTO DIRETO FIXO	
INSUMOS - Material de laboratório	12.96
Mão de obra direta	18.83
CUSTO DIRETO VARIÁVEL	
Material de laboratório	3.68
Equipamentos	1.38
Energia	1.07
Material de Lavagem	2.17
CUSTO DIRETO TOTAL	40.08
CUSTO INDIRETO FIXO (3% do total dos custos diretos)	1.20
Instalações laboratoriais (10% utilização no projeto)	
Serviço de limpeza	
Instalações elétricas e hidráulicas	
CUSTO INDIRETO VARIÁVEL (7% do total dos custos diretos)	2.81
Outros (Iluminação, Taxas água/esgoto, Administração, etc)	
CUSTO INDIRETO TOTAL	4.01
Custo do teste DOT-BLOT (US\$)	
custo total = 44 testes	44.09
custo do teste amostral em duplicata	1.00