

Capítulo 10

LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES: DIAGNÓSTICO, PREVENÇÃO E VACINAS

Raimundo Rizaldo Pinheiro
Méd. Vet. D.Sci. Virologia. Pesquisador III da Embrapa Caprinos

Luciano J. F. Ximenes
Zootecnista. Doutorando em Zootecnia/DZ-UFC
Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste – Etene/BNB

Alice Andrioli Pinheiro
Méd. Vet. D.Sci. Biotecnologia da Reprodução. Pesquisadora III da Embrapa Caprinos

Maria de Fátima da Silva Teixeira
Méd. Vet. D.Sci. Virologia Veterinária. UECE/FAVET

1 - INTRODUÇÃO

Logo após o início da colonização, os caprinos e ovinos foram destaque na produção de alimentos de alto valor nutricional para o Brasil, em especial para o Nordeste, em virtude da versatilidade que incorporaram sob os rigores do ambiente local. No entanto, a arte da pecuária destes pequenos ruminantes ainda é marcada pela desorganização dos elos da cadeia produtiva, apesar da importância destes animais nos aspectos social, econômico, cultural e ambiental para o país.

Dentre as dificuldades do setor, especialmente dentro da porteira, destacam-se: a estrutura fundiária das propriedades; a descapitalização dos produtores, que limita os investimentos em infraestrutura, além do nível educacional e organizacional destes; carência de assistência técnica; falta de entrosamento entre produtores e a agroindústria; o abate clandestino; a sazonalidade de produção; e a qualidade das carcaças, dentre outros. Assim, vários são os entraves tecnológicos nos sistemas de produção de caprinos e ovinos no Nordeste, que culminam com baixos índices zootécnicos e de rentabilidade. Dentre estes, a saúde animal tem evidência, pois, em um mercado cada vez mais exigente, a falta de controle sanitário dos rebanhos, além dos prejuízos decorrentes da queda da produção, da depreciação do rebanho e barreiras comerciais, é importante fator à estagnação ao mercado consumidor.

Neste sentido, as lentivirose como a Artrite Encefalite Caprina, peculiar por ser uma infecção crônica e incurável, tem causado grandes prejuízos aos produtores, até porque as medidas de controle severas, como o sacrifício dos animais diagnosticados como positivos, têm sido um desafio permanente, principalmente quando afeta reprodutores e matrizes de alto valor genético (ANDRIOLI, 2006). Além disso, a dependência de *kits* de diagnósticos importados, de elevado custo e burocracia para a aquisição, e o desafio a campo não têm permitido tanto um controle eficaz como, também, a erradicação definitiva da doença nos rebanhos.

Os projetos que subsidiaram a produção deste artigo estão associados à continuação de uma linha de pesquisa iniciada desde 1994, quando foi implantado um programa de controle da Artrite Encefalite Caprina na Embrapa Caprinos em parceria com a UFMG. Faz parte uma série de ações realizadas conjuntamente por várias instituições de pesquisa e ensino no país com o objetivo de controlar e erradicar as LVPR (Lentivirose de Pequenos Ruminantes) no Brasil. Os integrantes deste projeto fazem parte do Grupo de Estudo e Pesquisa de Ovinos e Caprinos (GEPOC) composto por 23 Professores, Pesquisadores e Técnicos de diferentes instituições (Escola de Veterinária e Instituto de Ciências Biológicas da UFMG,

Embrapa Caprinos, Fiocruz, Escolas de Veterinária das universidades UECE, UFRPE, UFRGS, UFRRJ). Os projetos também integram outro grupo de pesquisa emergente no Nordeste, o Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS).

2 - IMPORTÂNCIA E DESCASO COM A PECUÁRIA DE CAPRINOS E OVINOS

Os pequenos ruminantes desempenham importante papel nas provisões de alimento e de renda às populações de baixa renda, principalmente, dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde se dividem em raças que fazem parte dos mais inóspitos ecossistemas, desde regiões desérticas do continente africano até as montanhas rochosas do Norte europeu (STANDFORD, 1982; DEVANDRA, 1987; OLIVEIRA; JOHNSON, 1989; OLIVEIRA, 1990; BEN-DHIA, 1995; OLIVEIRA, 1996; ODO *et al.*, 2000; DEVENDRA, 2002). No Nordeste, apesar da expressividade efetiva e da importância destes animais, a criação de caprinos e de ovinos espelha caráter de subsistência, manejada de forma extensiva e com baixo nível tecnológico, voltada ao suprimento de alimento com preço mais acessível (FIGUEIREDO; SOUZA NETO, 1990) (Tabela 1). Contudo, proporciona sustento de alto valor proteico e energético com baixo custo, além da renda adicional gerada pela comercialização da pele, fatores que relevam a atividade como agregadora do fator econômico-social à agricultura familiar do semiárido.

Tabela 1 – Nível Tecnológico nas Propriedades Rurais de Caprinos e Ovinos no Ceará e em Três Mesorregiões¹ do Norte de Minas Gerais

Nível tecnológico ²	Propriedades com caprinos (%)		Propriedades com ovinos (%)	
	MG	CE	MG	CE
Bom	34,9	53,8	19,4	NI
Regular	40,7	16,0	37,9	NI
Baixo	24,4	30,2	42,7	NI
TOTAL	100,0	100,0	100,0	NI

Fonte: Adaptado de Gouveia (2003).

Nota:¹ Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri.

² Determinado por análise multidimensional, com base nos indicadores predefinidos de Sanidade (presença de quarentena, separação por faixa etária e cura de umbigo nos recém-nascidos), de Alimentação (suplementação com sal mineral, presença de capineira e de suplementação de fêmeas paridas), de Produção (grupo racial, objetivo de produção e sistema de criação), de Infraestrutura (presença de assistência técnica, de aprisco e de esterqueira) e de Formação do rebanho base (origem do rebanho e criação em consórcio com outras espécies animais).

Entre outros fatores, a alta incidência de problemas sanitários é um dos fatores limitantes ao aumento da produtividade destes animais no semiárido nordestino (SIMPLÍCIO *et al.*; AZEVEDO, 1982). Doenças provocadas por parasitas gastrintestinais, além daquelas de origem infecciosa, têm causado prejuízos econômicos aos produtores (Tabela 2).

Tabela 2 – Algumas enfermidades e sinais clínicos observados pelos criadores, em caprinos e ovinos, em rebanhos pesquisados no Ceará e em Minas Gerais¹, 2003

Enfermidade/ Sintoma Clínico	% CE	% MG
Abcessos/ Linfadenite caseosa	66,9	47,9
Aborto	75,6	41,2
Ectoparasitoses	63,8	30,0
Diarreias frequentes/ anemia/ edema facial	81,9	76,8
Ectima contagioso/ doenças vesiculares de pele	35,4	21,0
Alterações mamárias/ mamite	51,2	15,8
Ceratoconjuntivite	29,1	15,8
Pododermatite	67,7	12,4
Pneumonia	44,9	12,4
Sintomatologia nervosa	26,8	NI
Alterações articulares/ artrites	8,7	NI

Fonte: Adaptado de Gouveia (2003).

Nota: ¹Norte de Minas, Jequitinhonha e Vale do Mucuri.

3 - LENTIVIROSES

Dentre estas enfermidades, destaca-se a Artrite Encefalite Caprina (AEC). Trata-se de uma enfermidade infecto-contagiosa, incurável, degenerativa, provocada por um vírus da família Retroviridae e subfamília Lentivirinae (LVC), mesma família do HIV. Os principais sinais clínicos são: artrite, encefalite, mamite e pneumonia.

Nos ovinos, observa-se a Maedi-Visna (MVV), que se caracteriza como uma doença viral crônica e progressiva. O vírus relaciona-se antigenicamente com o CAEV, responsável por infecções persistentes com período de incubação longo com reações inflamatórias e degenerativas. As lesões são induzidas em tecidos específicos do hospedeiro, como articulações, pulmões, sistema nervoso central e glândulas mamárias devido à replicação viral em células da linhagem monocítico-fagocitária, que são as principais células-alvo. A infecção ocorre principalmente

durante os primeiros meses de vida, através da ingestão de vírus no leite ou colostro de cabras ou ovelhas infectadas. A indução da resposta imunológica é variável e não protege contra a infecção. O diagnóstico é baseado primariamente na detecção de anticorpos para LVPR, geralmente por imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA).

As perdas econômicas causadas pelas lentivirose ainda não estão claras nos estudos realizados e muitos resultados são controversos. Segundo Nord e Adnoy (1997), a infecção pelo vírus da CAE não provoca diferença estatística na produtividade leiteira entre animais soronegativos e soropositivos, ocorrendo apenas um aumento na contagem de células somáticas. No entanto, Greenwood (1995) observou que fêmeas múltiparas soropositivas produziram 88kg a menos de leite e perderam 21 dias em média no período de lactação. Além disto, fêmeas soropositivas tiveram estatisticamente mais problemas de saúde, além do alargamento da juntura carpal em relação às soronegativas. Tais resultados coincidem com os achados de Von Mockenhaupt e Bauer (1987) apud Greenwood (1995), que comentam que a alta incidência de problemas de saúde causados pela CAE se deve a uma imunodeficiência através da alteração da função dos macrófagos.

A moderna produção pecuária, com a oferta de produtos com qualidade, de modo a atender o exigente mercado consumidor, deve ser fundamentada na exploração racional em condições de bem-estar, de forma rentável consoante com a otimização dos recursos disponíveis, além do conhecimento dos fatores que interferem com a saúde animal. Neste sentido, destacam-se: instalações bem dimensionadas, animais bem alimentados e saudáveis. A saúde animal deve ser entendida não somente como a ausência ou presença de determinada doença, mas, sim, como um conjunto de condições determinantes no comportamento das características de interesse econômico de uma população animal.

Atualmente, têm surgido núcleos de criação de caprinos e ovinos com a introdução de raças de origem exótica, os quais fornecem animais especializados para serem usados em “esquemas” voltados para o “melhoramento genético”. Essas mudanças na forma de produção introduziram novos componentes (animais importados, agentes patogênicos, tecnologia) e relações de produção que culminaram em alterações no perfil sanitário. Assim, além dos problemas sanitários clássicos, outros têm sido identificados, dentre eles, a infecção pelos lentivírus CAE em caprinos e Maedi-Visna em ovinos, hoje, motivo de preocupação das autoridades sanitárias, que necessitam implantar medidas de controle e profilaxia. Segundo Silva (1996), o problema sanitário de maior relevância em caprinos ainda é a verminose,

seguida da CAE, que se tem disseminado pelo Brasil, em grande parte, devido ao desconhecimento do grau de comprometimento dos rebanhos e da dificuldade de acesso ao diagnóstico.

O conhecimento dos tipos de vírus existentes no Brasil é importante do ponto de vista zoossanitário e econômico (CUNHA, 1990), já que a realização das diversas provas de diagnóstico têm utilizado sorotipos importados. Tal fato tem trazido alguns problemas, tais como a elevação do custo da realização dos testes de IDGA, além da detecção de um número expressivo de resultados falso-negativos, em função da inexistência de *kits* comerciais ou de produção de antígenos virais com amostras brasileiras de LVPR. Desse modo, o isolamento e a caracterização de novas amostras virais provenientes de regiões geográficas distintas possibilitam melhorar os testes de diagnóstico.

3.1 - Distribuição das Lentivirose

Um fato importante sobre a epidemiologia desta doença é que foi introduzida no Brasil pela importação de animais infectados, em decorrência da ausência de programas de melhoramento genético no país. Assim, muitos produtores importaram animais de genótipo superior e, em consequência da ineficiência dos órgãos de fiscalização sanitária, a doença se espalhou pelo país (Tabela 3).

O primeiro isolamento de vírus da CAE no Brasil foi feito no Rio Grande do Sul por Hötzel *et al.* (1993), a partir de membrana sinovial caprina de animal soropositivo. Já o primeiro isolamento de MVV no país foi realizado por Moojen *et al.* (1996), a partir de cordeiro sorologicamente negativo e sem sinais clínicos. Outros isolamentos de LVPR de caprinos (ABREU, 1996) e de ovinos (MOOJEN *et al.*, 1996; RAVAZZOLO *et al.*, 1995; MILCZEWSKI *et al.*, 1997) foram feitos. Foram isoladas amostras de LVPR nos Estados de Minas Gerais (BrMg1-01, BrMg1-02, BrMg2-01, BrMg2-02 e BrMg2-03) e Pernambuco (BePe1-01) (CASTRO, 1998).

Para Maedi-Visna (MV), no Brasil, a doença foi registrada e seu agente isolado pela primeira vez, em ovinos, no Rio Grande do Sul (PIZZOL *et al.*, 1989; MOOJEN *et al.*, 1996). Sotomaior e Milczewski (1997) registraram a presença da enfermidade em um rebanho no Paraná. Pinheiro *et al.* (1996) não encontraram animais positivos em 165 amostras de ovinos pertencentes ao rebanho da Embrapa Caprinos de Sobral/CE e Yorinori (2001) encontrou resultados nulos para MV e reduzidos para Artrite Encefalite Caprina – CAE (0,3%) na região mineira. Nestes dois casos, o antígeno utilizado foi de um *kit* americano. Entretanto, num levantamento realizado em reprodutores ovinos, no Ceará, utilizando antígeno de MVV

Tabela 3 – Presença de Caprinos Soropositivos para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) por Estado do Brasil, 2003

Estado	Caprinos Soropositivos (%)	Autor
Bahia	+	Fiterman (1988)
	12,8	Assis & Gouveia (1994)
	9,2	Gouveia <i>et al.</i> (1998)
Ceará	+	Pinheiro <i>et al.</i> (1989)
	1	Pinheiro & Gouveia (2001)
	27,5	Assis & Gouveia (1994)
	40,7	Melo & Franke (1997)
Espírito Santo	47,5	Gouveia <i>et al.</i> (1998)
Goias	10,0	Gouveia <i>et al.</i> (1998)
Maranhão	50,6	Alves & Pinheiro (1997)
Minas Gerais	33,3	Assis & Gouveia (1994)
	5,9	Gouveia <i>et al.</i> (2003)
	0,3	Yorinori & Gouveia (2001)
	23,6	Gouveia <i>et al.</i> (1998)
	15,2	Gouveia <i>et al.</i> (2003)
Pará	40,0	Ramos <i>et al.</i> (1996)
Paraíba	9,0	Souza <i>et al.</i> (1999)
	3,0	Castro <i>et al.</i> (2000)
Paraná	6,64	Bertolini <i>et al.</i> (1995)
	28,2	Milczewski <i>et al.</i> (1997)
Pernambuco	17,6	Saraiva Neto (1993)
	17,7	Castro <i>et al.</i> (1994)
	3,9	Castro <i>et al.</i> (2000)
Piauí	4,4	Pinheiro <i>et al.</i> (1996)
Rio Grande do Sul	6,0	Moojen <i>et al.</i> (1986)
Rio de Janeiro	29,7	Assis & Gouveia (1994)
	21,0	Cunha & Nascimento (1995)
	10,6	Gouveia <i>et al.</i> (1998)
São Paulo	57,0	Araújo <i>et al.</i> (1991)
	49,0	Garcia <i>et al.</i> (1992)
	29,8	Fernandes (1997)

Fonte: Adaptado de Gouveia (2003).

Nota: + = Relato de caso clínico soropositivo.

do Instituto Pourquier (França), verificou-se que 50,9% de 112 ovinos de diferentes raças e com sintomatologia sugestiva da doença eram positivos (ALMEIDA *et al.*, 2002). No Rio Grande do Norte, num levantamento realizado em 14 municípios, em rebanhos ovinos criados semiextensivamente, verificou-se 30,2% de positivos para MV (SILVA *et al.*, 2002). Costa *et al.* (2007) isolaram o MVV em ovinos da raça Santa Inez no Estado de Pernambuco e verificaram sorologia positiva em 1,07% dos animais e 12% dos rebanhos infectados.

Com base na análise filogenética de 21 isolados na França de LVPR de origem caprina e ovina, surgiu a seguinte classificação: grupos I e III (isolados de origem caprina e ovina), II (isolados de origem caprina, incluindo o CAEV Cork) e IV (3 isolados ovinos de referência K1514, AS-OMVV e EV1). Concluiu-se, assim, que os LVPR constituem um grupo grande e heterogêneo e não uma coleção de espécies distintas com hospedeiros e potencial patogênico bem definidos (LEROUX *et al.*, 1997). Castro (1998), analisando filogeneticamente isolados brasileiros de LVPR, concluiu que os isolados de Minas Gerais foram mais relacionados ao vírus da CAE, enquanto o isolado de Pernambuco foi estreitamente relacionado ao isolado islandês MVV K1514.

O conhecimento mais aprofundado das características dos vírus isolados é extremamente importante, pois tem sido demonstrado que amostras de LVPR podem apresentar diferenças biológicas e moleculares significativas (QUÉRAT *et al.*, 1984; LAIRMORE *et al.*, 1987; BLONDIN *et al.*, 1989). A diversidade genética é bem característica dos lentivírus e provavelmente esteja relacionada diretamente à diversidade do curso da patogenia e epidemiologia, sendo o entendimento desta essencial no estabelecimento de programas de controle.

3.2 - Transmissão

A aquisição ou troca de reprodutores são práticas rotineiras que facilitam a sua abrangência, principalmente quando não são utilizadas medidas profiláticas. Por outro lado, a evidência sorológica da presença do lentivírus em reprodutores caprinos, associada à recente detecção do vírus no sêmen de caprinos infectados (ANDRIOLI *et al.*, 1999), sinaliza que a dispersão do agente entre plantéis pela introdução de reprodutores soropositivos ou de sêmen congelado deve ser considerada quando do estabelecimento de programas de controle da CAE.

A transmissão do LVC pela via reprodutiva não está totalmente esclarecida, pois a detecção do CAEV no sêmen, por si só, não comprova a sua transmissão por esta via (ANDRIOLI, 2001), embora fatores associados, como a presença de infecções testiculares, possam aumentar a carga viral do vírus no sêmen (ANDRIOLI *et al.*, 2006). Desta maneira, está sendo investigado se o sêmen contaminado é um veículo do vírus.

Rowe *et al.* (1992) observaram que as maiores respostas imunológicas foram aquelas de fêmeas emprenhadas por reprodutores soropositivos para CAE em relação àquelas expostas a reprodutores soronegativos. No entanto, Adams *et al.* (1983) observaram que as fêmeas não-soropositivas se converteram após a

exposição ao sêmen e aos machos soropositivos. Também, Andrioli *et al.* (2006) não constataram a soroconversão de cabras submetidas à monta natural com reprodutores positivos.

Pode ser que o sistema imunológico das fêmeas possua defesas competentes contra o vírus ou a carga viral no sêmen seja muito pequena; daí, o risco de transmissão do LVC pelo sêmen seja baixa. No entanto, estudos neste sentido devem ser realizados para avaliar o real risco de transmissão do vírus pela via reprodutiva.

Neste sentido, o controle profilático, como a apartação da cria logo após o parto, o fornecimento de colostro pasteurizado e o sacrifício dos animais soropositivos, são as principais medidas recomendadas. Estas características sinalizam que a prevalência da doença é mais efetiva em rebanhos leiteiros, conforme estudo conduzido por Pinheiro *et al.* (2001). Neste trabalho, que envolveu 130 rebanhos do Estado do Ceará e 4.019 animais, foi diagnosticado 1% dos animais como soropositivos para AEC; destes, somente 0,12% (3/2410) são provenientes de animais SRD, nativos e mestiços, enquanto 4,6% (37/810) são de animais com vocação para leite.

Nestas circunstâncias, o rebanho da Embrapa Caprinos foi severamente prejudicado, com importante impacto econômico, também provocado pelo sacrifício dos animais soropositivos. Então, foi instalado um programa de monitoramento sorológico semestral, implantado em 1994, para controle e erradicação da CAE. No entanto, apesar desta vigilância, a doença não foi erradicada, pois o teste de Imunodifusão em Gel de agarose possui uma sensibilidade em torno de 75%. Até recentemente, a detecção do lentivírus em amostras de sêmen não havia sido descrita, em função da indisponibilidade de técnicas como PCR.

Andrioli *et al.* (2007) obtiveram resultados negativos no IDGA de 40% de amostras coletadas, mensalmente, de animais naturalmente contaminados com o LVC, dentro de um período de três anos. Também observaram que amostras de soro e sêmen coletadas no mesmo dia nem sempre apresentavam resultados concordantes, sendo que houve a detecção do vírus no sêmen sem a presença de anticorpos no soro em 4% das amostras. Neste sentido, surge a necessidade de avaliação de testes mais sensíveis, imunológicos e/ou de biologia molecular (ELISA, DotBlot e a PCR), que possam detectar os falso-negativos testados por IDGA. Não obstante, tornara-se imperativa a produção de *kits* nacionais, a fim de baixar o custo do monitoramento sorológico dos rebanhos e de vacinas contra o CAEV, para a implantação de programas efetivos de erradicação em diferentes condições ambientais.

Atualmente os programas de controle da infecção por LVPR têm sido adotados em vários países, geralmente de adesão voluntária, baseados na triagem de animais pelo método sorológico de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), realizado periodicamente nos animais, com separação ou eliminação dos positivos e uso de práticas de manejo específicas contra a disseminação do vírus (OIE, 1996; FAO, 1996, OIE, 1999). Recomenda-se, então, separar as crias imediatamente após o nascimento, evitar o contato com secreções e isolá-las dos adultos, administrar colostro ou leite termicamente tratados, alimentar as crias com substitutos do leite, adotar a linha de ordenha, controlar a monta com reprodutores positivos e usar material estéril (GOUVEIA *et al.*, 1996; CONCHA-BERMEJILLO, 1997; ROWE; EAST, 1997).

3.3 - Vacina contra o Vírus da Artrite Encefalite Caprina

A equipe liderada pela Dra. Fátima Teixeira iniciou testes com antígenos para diagnóstico do vírus da CAE (CAEV), por meio da constituição de uma “quimera” entre a proteína P28 do CAEV e o Capsídio do Vírus do Mosaico Severo do Caupi (CVMSC), como desencadeadora da resposta imune, necessária à produção de antígenos para diagnóstico. Os resultados preliminares indicaram que, em camundongos, houve reação imunológica de defesa, ou seja, que a molécula produzida foi efetiva na produção de anticorpos. Então, os resultados sinalizam para a possibilidade de uso da quimera como antígeno para produção de *kit* de diagnósticos nacionais ou para produção de vacina contra lentivírus. Com base nos resultados observados, a linha de investigação por meio de projeto em andamento é a avaliação desta quimera na espécie susceptível à doença: os caprinos.

A forma ideal de prevenir doenças e também o primeiro passo para a sua erradicação é vacinar o rebanho.

No caso específico das LVPR, não existem vacinas comercialmente disponíveis. Várias tentativas para elaborar uma vacina contra os lentivirus ocorreram, embora tenha havido alguns avanços, nada de concreto foi ainda elaborado. Convém salientar que as pesquisas envolvendo vacinas constituem um longo processo desde a elaboração do protótipo laboratorial com os testes *in vitro* e os testes *in vivo* em animais de laboratório e, finalmente, na espécie a que se destinam. Caso logrem êxito, ainda deverão passar por todos os testes de inocuidade, padronização, registro comercial e disponibilidade para uso, prazo este que se estende de 10 a 15 anos até sua finalização.

A primeira tentativa de confecção de vacinas foi realizada na década de 1980, quando uma vacina a base de sobrenadante de cultivo celular de membrana sinovial caprina inativada foi utilizada em caprinos. A experiência não foi bem-sucedida, visto que os animais vacinados apresentaram um quadro de artrite mais severa que os próprios animais controle (CUTLIP *et al.*, 1987).

O Gênero Lentivirus desperta grande interesse, haja vista que, neste grupo, encontram-se inseridos diversos representantes. Além do CAEV e MVV, outros como FIV (Imunodeficiência Felina), BIV (Imunodeficiência Bovina), AIEV (Anemia Infeciosa Equina), SIV (Imunodeficiência Símia) e HIV (Imunodeficiência Humana), sendo este último o que mais carrega recursos para pesquisa visando minimizar e resolver de uma vez por todas esta problemática causada por tais vírus.

Felinos imunizados com vacina FIV petaluma inativada apresentaram proteção contra o desafio com o vírus homólogo (YAMAMOTO *et al.*, 1991).

Possível Vacina contra MVV, constituída do gen clonado da gag poliproteína e proteínas p16 e p25 fusionadas com a beta galactosidase. Camundongos inoculados com Sc p16 apresentaram uma forte resposta quando comparados aos controles (HERIQUES *et al.*, 2007).

No tocante às vacinas recombinantes em projeto com apoio do BNB, foi desenvolvido um protótipo de vacina utilizando o CPSMV (Vírus do Mosaico Severo do Caupi) como vetor de expressão da p28 do CAEV, em que foi obtido um antígeno para uso diagnóstico como também foi demonstrada atividade imunogênica com formação de anticorpos detectados por teste de ELISA indireto como indicativo de bons resultados (SOUZA *et al.*, 2005).

Três grupos de dez camundongos Swiss, fêmeas com 7 a 8 semanas de idade foram imunizadas por via subcutânea, na região dorsal, com 10 μ g de proteína do vírus CPSMV, 10 μ g da proteína P28 do CAEV e 10 μ g da quimera (CPSMV + P28), utilizando o adjuvante de Freund incompleto, respectivamente. Os animais receberam reforços com 21 e 35 dias após o início da imunização e foram sangrados nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias após o início da imunização. Os resultados foram avaliados através de teste de ELISA indireto, como pode ser observado no Gráfico 1A (SOUSA, 2003; SOUSA *et al.*, 2005).

4 - DIAGNÓSTICO DOS LENTIVIRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

O diagnóstico dos LVPR fundamenta-se no quadro clínico (quando presente), consolidado por provas laboratoriais para detecção direta do vírus ou do seu

material genético, ou, ainda, através da detecção de anticorpos. 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 quanto ao seu caráter de infecção persistente, a sorologia para detecção do LVPR é uma forma funcional de diagnóstico, podendo ser realizada através de técnicas como imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Dot-Blot* e *Immunoblotting*.

4.1 - Isolamento Viral

O isolamento viral em cultivo de células tem sido um dos métodos laboratoriais de diagnóstico mais utilizados em virologia, sendo considerado um teste padrão. O isolamento tem também a vantagem de discriminar entre microrganismos vivos e mortos. No entanto, a técnica, apesar de sensível, apresenta algumas restrições, pois é laboriosa, onerosa e lenta, necessitando de implantação de cultivos celulares especiais, além de não detectar os vírus que não causam Efeito Citopático (ECP) em cultivos celulares (KNOWLES, 1997). Para o isolamento do lentivírus caprino de amostras clínicas, utiliza-se cultivo primário de células de Membrana Sinovial de Caprinos (MSC), sendo que o ECP característico é a presença de células multinucleadas típicas (sincício). Os LVPR podem ser isolados de amostras de animais vivos, tanto pelo cocultivo em MSC de células, como leucócitos do sangue periférico, células somáticas do leite, sêmen e fluidos uterinos, como, também, de animais mortos infectados, a partir de explantes de tecidos como membrana sinovial (MSC), glândula mamária, pulmão, plexo coroide e tecidos linfóides.

Como uma das características principais dos lentivírus é apresentar replicação lenta, eles necessitam de, no mínimo, três passagens de células, com sete dias de intervalos, para que o ECP comece a ser observado. Uma grande variação é verificada quanto ao tipo e ao tempo de aparecimento do ECP produzido pelos isolados; além disso, os isolados virais de LVPR podem não causar efeitos citopáticos evidentes (OLIVER *et al.*, 1981).

A Embrapa Caprinos, através deste projeto, implantou as técnicas de cultivo celular de membrana sinovial caprina e membrana sinovial ovina; com isto, deu suporte para a produção de antígeno nacional. Com o domínio destas técnicas, torna-se possível a realização de cocultivo de amostras clínicas (leucócitos, líquido sinovial, lavado bronqueal, sêmen etc.), o que viabilizará em breve a produção de antígeno com cepas regionais.

4.2 - Microscopia Eletrônica (ME)

As partículas virais do CAEV medem de 70 a 110nm, com um corpo central de 30 a 50nm e apresentam forma e tamanho semelhantes aos do MVV. Nas células infectadas com LVPR, observam, por ME, vários brotamentos virais com 120 a 140nm de diâmetro além de vírions livres no espaço extracelular, medindo de 80 a 110nm de diâmetro, e vírions e fragmentos virais no citoplasma de células infectadas. Os brotamentos virais na sua superfície ocorrem geralmente dentro de pequenos vacúolos citoplasmáticos, sendo estes brotamentos similares àqueles de retrovírus do tipo C (MOOJEN, 1996). Este método é interessante para estudo de ultraestrutura dos vírus. Entretanto, é uma técnica muito cara e trabalhosa para sua utilização em rotina de diagnóstico.

4.3 - Hibridização *In Situ* (HIS)

Esta técnica consiste na identificação de segmentos específicos de ácido nucléico de origem viral, encontrados em tecidos ou células infectados, capazes de serem detectados por sondas marcadas por enzimas ou por radioatividade (BROWN, 1998). Esta técnica é de uso limitado, em decorrência da alta mutabilidade dos LVPR, além de ser laboriosa e cara para ser colocada em rotina. Entretanto, pode ser utilizada para dirimir dúvidas de resultados duvidosos.

4.4 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação *in vitro* dos ácidos nucléicos permite a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA. Desta maneira, a PCR vem sendo adotada em todo o mundo na pesquisa de microrganismos, devido à especificidade, sensibilidade e rapidez de seus resultados. É possível detectar o DNA proviral do LVC um dia após a infecção dos cultivos celulares, e de apenas uma célula infectada em um cultivo de 10^6 células, sendo que a PCR é uma técnica eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença (ZANONI *et al.*, 1990).

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 1980, e têm sido de grande importância para o diagnóstico de doenças virais, visto que os métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos, como cultivo de células e microscopia eletrônica. Outra vantagem da PCR é que esta técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA viral presentes no material, amplificando-os em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob

estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro, ou, ainda, microrganismos mortos, podem ser detectados pelo método.

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA-proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras, como sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite, tecidos, sêmen, fluidos uterinos e embrião. No caso dos LVPR, esta técnica é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso. Porém, parece não haver relação entre o título de anticorpos e o aparecimento de bandas positivas à PCR no sangue e nem todas as amostras positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR. Cerca de 3.000 monócitos, contendo de 30 a 240 células infectadas são suficientes para gerar resultados positivos na PCR. Porém, há uma quantitativa diferença no nível de células associadas ao vírus entre animais, os quais podem variar de 10^3 a 10^5 monócitos para a detecção. Desse modo, parece que a taxa de infecção dos monócitos varia entre indivíduos portadores da CAE, provavelmente, devido ao nível de restrição da expressão viral. Portanto, a sensibilidade depende do tamanho da amostra (ANDRIOLI, 2001).

A PCR *Nested* ou PCR duplo *Nested* aumenta a sensibilidade quando comparada à PCR simples, enquanto a combinação do uso de PCRs múltiplos reduz o número de falsos negativos. Porém, estas técnicas são mais caras e trabalhosas, além de apresentarem, no caso da PCR *Nested*, grande risco de contaminação do laboratório com DNA amplificado levando à ocorrência de falsos positivos (ANDRIOLI, 2001).

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.

Neste projeto, a técnica de PCR e de PCR *Nested* foram padronizadas para sangue. A sensibilidade relativa do teste a PCRn identificou as bandas esperadas entre $10^{4,5}$ a $10^{0,5}$ TCDI₅₀/50 μ L em sobrenadante de cultivo celular inoculado, quando se utilizaram os iniciadores externos. Com a realização da segunda etapa – PCR *Nested*, utilizando os iniciadores internos –, as bandas esperadas foram obtidas entre $10^{4,5}$ a 10^{-3} TCDI₅₀/50 μ L. A especificidade das amplificações foi confirmada pela obtenção dos fragmentos esperados após a restrição enzimática (enzima Bal I) dos produtos amplificados pela PCR *Nested* das amostras de sêmen e do controle positivo.

Foram testados vários protocolos de extração de DNA seguida de PCRn, sendo que três apresentaram resultados promissores. No entanto, nenhum apresentou

resultado positivo em todas as amostras testadas, de um mesmo animal, em ocasiões diferentes (ANDRIOLI et al., 2007), sendo que isto também ocorre nos testes de IDGA. Possivelmente, o DNA viral não estava presente no seu sangue ou estava em quantidade não-detectável (ANDRES et al., 2005).

Embora a PCR identifique animais portadores do LVC antes da soroconversão, tem-se relatado que, após a soroconversão, a PCR é menos sensível quando comparada aos testes sorológicos, de forma que há recomendação de que se utilize a associação dos dois testes num programa de controle (ANDRES et al., 2005).

A dificuldade em amplificar o DNA-proviral dos lentivírus pode estar na sua característica de alta taxa de mutação. A variação das sequências de bases no genoma dos lentivírus afeta a eficiência da PCR, pois esta é intimamente dependente da complementaridade entre os *primers/templates* (PASICK et al., 1998). Os LVPR apresentam grande variação antigênica e existem também variações fenotípicas que refletem o potencial patogênico do vírus (PASICK et al., 1998). Os vírus RNA, de forma geral, e particularmente os lentivírus, apresentam grande variedade de quasispécies, o que se atribui ao fato de o RNA polimerase ter, intrinsecamente, altas taxas de erro. Desta maneira, os lentivírus se reproduzem imperfeitamente. Este mecanismo é útil aos vírus na sua habilidade de escape das defesas do hospedeiro e de produzir infecção persistente. Desse modo, a escolha dos *primers* é de suma importância para o sucesso da técnica de PCR.

Estudos comparando a presença do vírus no sêmen com a de anticorpos no soro, coletados no mesmo dia, detectaram que, embora os anticorpos estejam presentes em 84,6% das amostras analisadas, no sêmen, a presença do vírus foi detectada em 10,8% das partidas (Tabela 4).

Observou-se também que o vírus foi detectado no sêmen e o anticorpo no soro em quatro ocasiões (6,1%); foi detectado apenas o DNA no sêmen em três

Tabela 4 – Comparação dos Resultados de PCR no Sêmen e IDGA no Sangue, Coletados no Mesmo Momento de Quatro Reprodutores Portadores da CAE

IDGA - soro	PCR - sêmen	
	Positivo	Negativo
Positivo	4 (6,1%)	51 (78,5%)
Negativo	3 (4,6%)	7 (10,8%)

Fonte: Dados do autor.

momentos (4,6%); foi detectado apenas o anticorpo no soro em 51 ocasiões (78,5%) e não foi identificado nem o anticorpo nem o DNA em sete momentos (10,8%).

Estes resultados nos fornecem informações importantes, como: um único teste de IDGA não é suficiente para comprovar a negatividade de um reprodutor, e o fato de este reprodutor apresentar resultado negativo no IDGA não indica que o animal esteja livre da presença do vírus no sêmen, como foi observado em três ocasiões em que foi detectado o DNA no sêmen; porém, o IDGA realizado no soro coletado no mesmo dia da coleta resultou negativo. Podemos observar também que a PCR no sêmen não é um bom teste para avaliação do reprodutor e, sim, apenas da partida do sêmen.

Através de esfregaços de sêmen corado com Rosenfeld observou-se a presença de leucócitos. Sabe-se que, normalmente, ocorre a presença de leucócitos no sêmen e que estas células são de eleição para a replicação do lentivírus caprino. Desse modo, sugerimos que seja realizado um ensaio mensurando a quantidade de leucócitos presentes no sêmen e relacionando com o teste de PCR no sêmen.

4.5 - Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Devido à praticidade na coleta das amostras e ao baixo custo/benefício, a detecção de anticorpos contra LVPR é amplamente utilizada, sendo a IDGA recomendada para o diagnóstico inicial de triagem num rebanho ou região onde seja desconhecida a prevalência da CAE. Este teste é 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 se precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação.

O teste de Microimunodifusão (MIDGA) para o diagnóstico dos lentivírus reduz o custo por diminuir comparativamente a quantidade de antígeno necessário no teste. O MIDGA mais utilizado é o hexagonal por apresentar melhores resultados, dado que a amostra de soro a ser testada fica posicionada entre dois padrões positivos, facilitando a leitura do resultado (GOUVEIA *et al.*, 2000).

Com relação ao antígeno produzido pela Embrapa Caprinos, após a clarificação dos 2.500ml de sobrenadante viral, produzido em cultivo celular, este foi concentrado 50 vezes no sistema de filtração AMICON® utilizando uma membrana com o *cut-off* de 10Kda e produziu-se 50mL de antígeno. O antígeno, após a concentração,

sofreu um tratamento com éter para destruir as glicoproteínas e limpar os epitopos das coreproteínas.

4.6 - 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 absorver energia luminosa, tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo. 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).

Esta técnica pode ser usada para detectar e titular anticorpos, como também identificar e localizar antígenos.

São poucos os trabalhos, na literatura, empregando RIFI no diagnóstico dos LVPR. 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%. Utilizada como referência em outras retrovirose, tais como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a RIFI chega a 100% de concordância entre o ELISA e *Immunoblotting* (REISCHAK, 2000).

Apesar de a técnica apresentar uma boa sensibilidade e ser relativamente barata, é necessário um treinamento específico, principalmente com relação à leitura dos resultados.

5 - ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

5.1 - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) baseia-se 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 vista a olho nu e quantificada mediante o uso de um espectrofotômetro (ABBAS; LICHTMAN, 2003).

Diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para LVPR, em que são empregados tanto antígenos nativos como recombinantes.

De acordo com o antígeno e a técnica do ELISA empregados (indireto, sanduíche etc.), existe uma grande variação de sensibilidade e especificidade. Apesar disto, esta técnica, de uma maneira geral, apresenta boa sensibilidade e mantém alta a especificidade, sendo, portanto, indicada na utilização de programa de controle desta enfermidade. É aconselhável a utilização de antígeno com pelo menos duas ou mais proteínas, de preferência a core proteína p28, a transmembrânica gp40 e a de superfície gp135, ou com o vírus total.

O antígeno produzido na Embrapa Caprinos utilizou o vírus total, portanto, todas as proteínas virais estão presentes no antígeno. Comparando-se o ELISA indireto e o IDGA produzidos verificaram-se os resultados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Resultado do Teste de Soros Caprinos pelo Elisa Indireto e IDGA Ag N para o Diagnóstico da Infecção por LVC em Rebanho Caprino Submetido a um Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA AgN	50	8,88	513	91,12	563
ELISA	112	19,89	211	80,11	215

Fonte: Dados do autor.

Tabela 6 – Valores Estimados de Sensibilidade (Sens), Especificidade (Espec), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN), Eficiência (Efic), Índice Kappa e Qui-Quadrado para os Testes do ELISA Indireto em Relação ao IDGA com Ag Nacional de 563 Amostras de Soro Caprino em Rebanho Submetido a um Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina

		ELISAI – AgNacional		
		Pos	Neg	Total
IDGA - AgNacional	Pos	45	5	50
	Neg	67	446	513
	Total	112	451	563

		ELISAI – Ag Nacional		
		Pos	Neg	Total
Ag Nacional	Pos	45	5	50
	Neg	67	446	513
	Total	112	451	563

Teste	Sens (%)	Espec(%)	VPP(%)	VPN(%)	Efic(%)	Kappa	χ^2^*
IDGA AgN	40,2	98,9	90	87,0	87,2	0,5	164,45 (p<0,001)

Fonte: Dados do autor.

Nota: *Qui-quadrado com correção de Yates.

Diante dos dados, verifica-se um aumento do número de animais soropositivos detectados pelo ELISA indireto e para o IDGA, ambos utilizando o Antígeno Nacional. O ELISA indireto detectou 112 animais, enquanto o IDGA somente 50 animais.

5.2 - Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-imunoblotting)

O *Dot-imunoblotting* pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras, ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. As amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose coberta com anticorpos e analisadas 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 (PINHEIRO, 2001).

No diagnóstico da CAE, o DB é um teste com boa resolução e baixa reação inespecífica, sendo mais viável que a IDGA e o ELISA *indireto* para utilização no controle desta enfermidade, 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 (PINHEIRO, 2001). Ensaios preliminares foram realizados na Embrapa Caprinos para a sua padronização.

5.3 - Immunoblotting ou Western Blotting

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. Na sua execução, o material proteico viral é separado por eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Na membrana, 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. O *immunoblotting* detecta anticorpos para p28 já aos 4 dias pós-infecção, enquanto no ELISA indireto os anticorpos são detectados 15 a 20 dias pós-infecção (BJERRUM; HEEGAARD, 1988). Comprova-se, assim, a alta sensibilidade do *immunoblotting* para detecção precoce de anticorpos para o CAEV. Apesar de ser considerado como *teste padrão ouro*, não se conhece a sensibilidade relativa do *immunoblotting* para detecção de anticorpos para LVPR. Esta técnica foi padronizada na Embrapa Caprinos durante a realização deste projeto; entretanto, por ser muito trabalhosa e lenta, não pode ser utilizada rotineiramente.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção precoce e a remoção dos animais infectados dos rebanhos são a base do sucesso dos programas de controle. Portanto, a eficiência de programas de controle das LVPR depende da sensibilidade e da especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização em animais de um determinado rebanho e do manejo utilizado neste mesmo rebanho. A identificação dos animais infectados por LVPR é geralmente feita de forma indireta, sendo a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) com antígenos de origem ovina e caprina o teste comumente empregado. 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. Entretanto, 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 destas enfermidades, o que leva à necessidade de uma troca de antígenos periódica para melhorar o diagnóstico.

Com o objetivo de isolar cepas de LVPR regionais para produção de um antígeno mais sensível e um estudo molecular destas cepas, nova parceria foi realizada entre a Embrapa Caprinos e o Banco do Nordeste através de um projeto. A grande variabilidade antigênica e genética dos LVPR induz a necessidade do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico dos LVPR, para que se possa reduzir o número de resultados falso-negativos. No caso de programas de controle mais avançados ou programas de erradicação, devem ser utilizadas provas sensíveis como o ELISA, associadas a provas de detecção direta, como a sua PCR, estes desenvolvidos e/ou padronizados na Embrapa Caprinos com o ajuda financeira do Banco do Nordeste.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. U.S.A.: Saunders Comp., 2003. 469p.

ANDRES, D. D. *et al.* **Vet. Microbiol.**, [S. l.], v. 25, n. 107, p. 49-62, 2005.

ANDRIOLI, A. **Relatório do projeto: associação de biotécnicas reprodutivas e da biologia molecular no estudo transmissão do lentivírus caprino (LVC) pelo sêmen e no desenvolvimento de técnicas para obtenção de germoplasma livre do vírus. Dados não publicados.**

_____. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ANDRIOLI, A. *et al.* Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S. l.], v. 41, p. 1.313-1.319, 2006.

ANDRIOLI, A. *et al.* Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S. l.], v. 23, p. 420-421, 1999.

ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; SOUZA, K. C. Estudo sobre a transmissão do lentivírus caprino através do sêmen. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 33., 2006, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2006..

BROWN, C. In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. **Vet. Pathol.**, [S. l.], v. 35, n. 3., p. 159-167, 1998.

COSTA, L. S. P. *et al.* Lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos Santa Inês: isolamento, identificação pela PCR e inquérito sorológico no Estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 11-16, 2007.

CUTLIP, P. R. C. *et al.* Failure of experimental vaccines to protect against infection with ovine progressive pneumonia (maedi-visna) virus. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 13, p. 201-204, 1987.

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.

MOOJEN, V. **Caracterização de isolados de lentivírus de pequenos ruminantes naturalmente infectados, do Rio Grande do Sul, Brasil.** Tese (Doutorado) – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1996. 247p.

PASICK, J. Maedi-Visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Can. J. Vet. Res.**, [S. l.], n. 62, p. 241-244, 1998.

SCHADE, K. H. **Light microscopy: technology and application.** 2. ed. Munchen: Verag Moderne Industrie, 1995. 70p.

SOUZA F. J. S. Uso de vírus que infectam plantas como molécula carreadora de proteínas patogênicas de interesse da Medicina Veterinária. 2003. 36f. Dissertação

(Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

SOUSA, F. J. S. *et al.* Vírus do Mosaico Severo do Caupi – CPSMV como molécula carreadora para a p28 do vírus da artrite encefalite caprina – CAEV. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1.363-1.367, 2005.

ZANONI, R.; PAULI, L. T.; PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna viruses using polymerase chain reaction. **Experientia**, [S. l.], v. 46, p. 316-319, 1990.

YAMAMOTO, J. K. *et al.* Experimental vaccine protection against feline immunodeficiency virus. **AIDS Research humane retrovirus**, [S. l.], v. 7, p.911-921, 1991.

ANEXOS

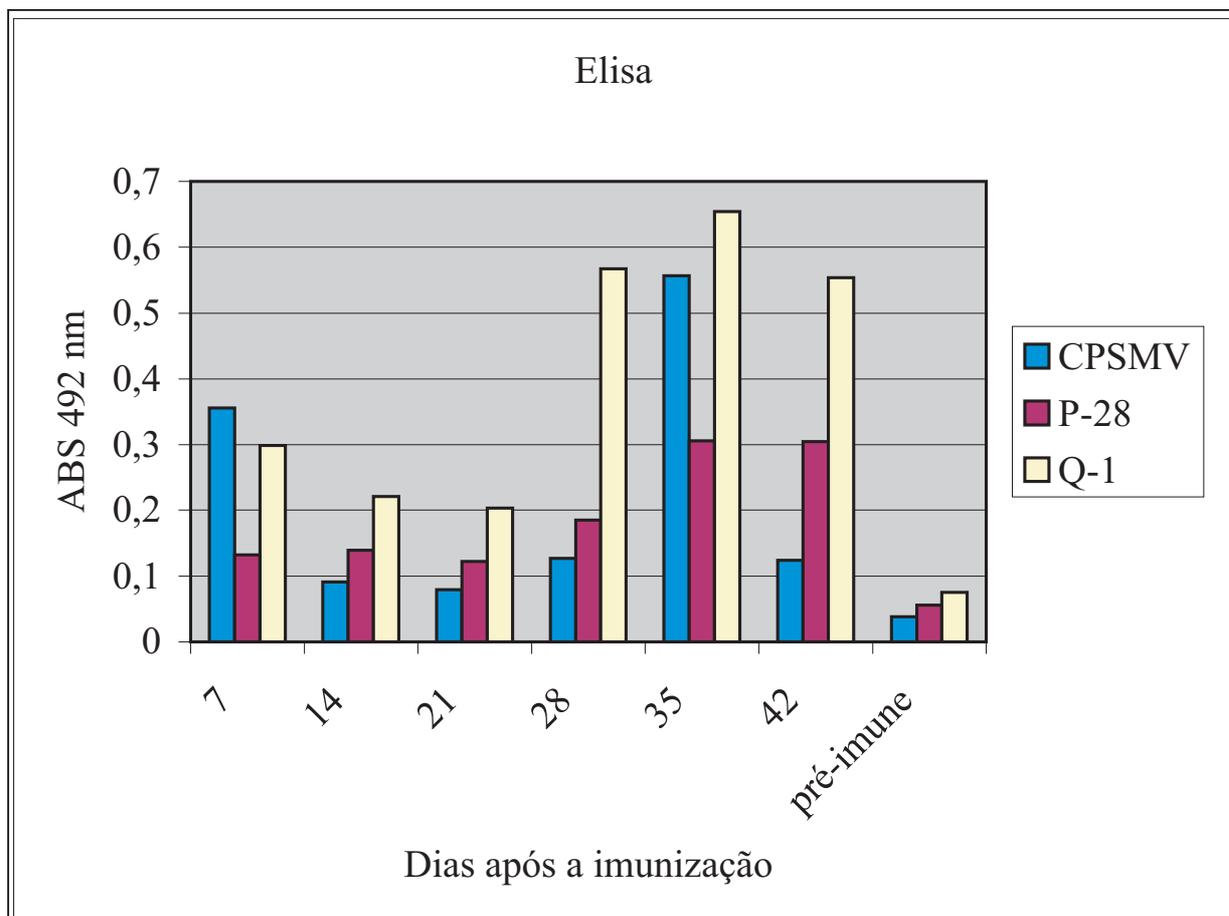


Gráfico 1A – Teste de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) com Antissoro Policlonal de Camundongos Imunizados com 10 μ g de Quimera (CPSMV+P28) com Adjuvante de Freund Incompleto, na Diluição de 1:40, Mostrando Reações Específicas contra o CPSMV (■), P28 (■) e Quimera (■)

Fonte: Dados do autor.

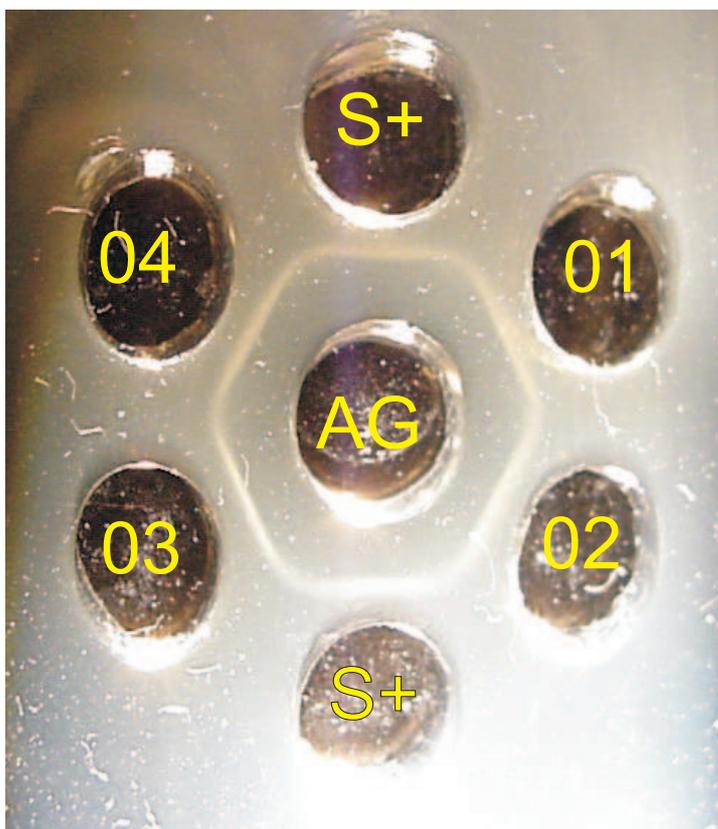


Foto 1A – Teste de IDGA com Antígeno de CAEV frente a Soros Padrões e Animais Positivos

Fonte: Dados do autor.

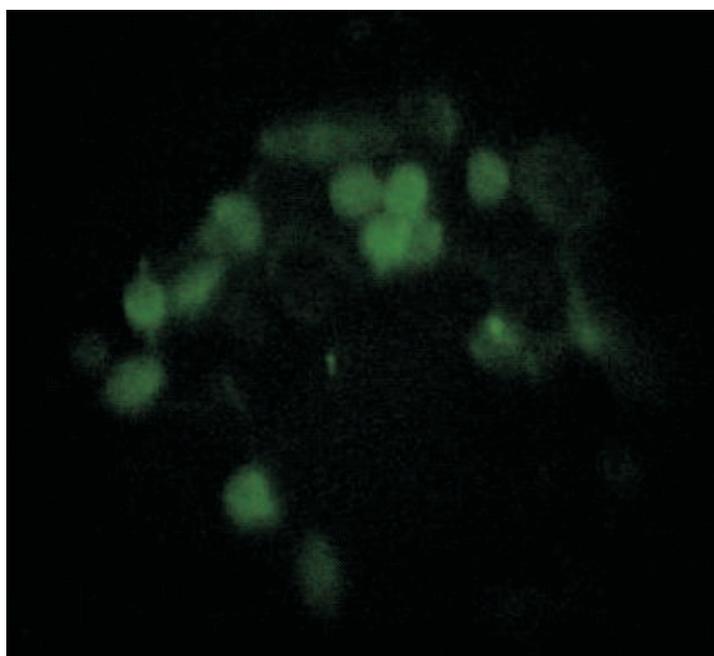


Foto 2A – Imunofluorescência indireta de soro positivo para LVPR (400x)

Fonte: Dados do autor.