



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

APOLIANA DE SOUSA RODRIGUES

**PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS
COMO FERRAMENTAS PARA CONTROLE DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA EM REBANHO LEITEIRO
SEMI-INTENSIVO**

**FORTALEZA
2012**

APOLIANA DE SOUSA RODRIGUES

PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS
COMO FERRAMENTAS PARA CONTROLE DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA EM REBANHO LEITEIRO
SEMI-INTENSIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e sanidade de pequenos ruminantes.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

FORTALEZA
2012

R696p Rodrigues, Apoliana de Sousa.
Padronização e utilização de testes sorológicos como ferramentas para controle da Artrite Encefalite Caprina em rebanho leiteiro semi-intensivo / Apoliana de Sousa Rodrigues . — 2012.
CD-ROM : 87f. il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2012.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira.
Co-orientação: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

1. CAEV. 2. Controle. 3. Diagnóstico. 4. Lentivírus de pequenos ruminante. I. Título.

CDD: 636.089

APOLIANA DE SOUSA RODRIGUES

PADRONIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS
COMO FERRAMENTAS PARA CONTROLE DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA EM REBANHO LEITEIRO
SEMI-INTENSIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
EMBRAPA Caprinos e Ovinos/
Universidade Estadual Vale do Acaraú
Co-orientador/Examinador

Prof. Dra. Alice Andrioli Pinheiro
EMBRAPA Caprinos e Ovinos/
Universidade Estadual Vale do Acaraú
Examinadora

“O Universo, por si só, exige a existência de um ser superior que foi capaz de fazer dele uma realidade. Se não há um Deus Criador, então, fica difícil, senão impossível, explicar a existência da vida”.

Gutfried Wilhelm Leibnitz

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) e ao Laboratório de Virologia (LABOVIR) pela a oportunidade que me foi dada para a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro, o qual foi imprescindível para o andamento desta pesquisa.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos e Ovinos, pela concessão das condições técnicas e estruturais para realização deste estudo.

Ao meu criador, Deus. Sou muito grata pelas bênçãos recebidas, por guiar a minha vida e por sempre renovar as minhas forças.

Aos meus pais, Rosa Maria e Francisco Fernandes por seu grande amor e dedicação, os quais não mediram esforços para me ajudar.

Aos meus irmãos, Lidiane, Juliana e Rafael por sempre torcerem por mim e se alegrarem por mais uma conquista na minha vida.

Ao Adílio Costa pelo grande incentivo.

A Verônica Sousa, minha cunhada, por sempre estar pronta a me ouvir.

A profa. Dra. Maria Fátima pelo carinho, amizade e orientação.

Ao Dr. Raymundo Rizaldo pela a oportunidade de aprendizado que me concedeu ao tempo que passei na Embrapa, o qual foi imprescindível para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Obrigada pela confiança e auxílio.

Ao Ronaldo pela amizade, mensagens enriquecedoras e orações.

A Roberta Lomonte pela atenção, paciência, carinho e por tantas coisas que me ensinou perto ou longe sempre me ajudou nos momentos que mais precisei. Obrigada!

A Dra. Alice Andrioli pela colaboração e ensinamentos prestados.

Ao prof. Dr. Isaac Neto pela atenção e contribuição.

A Samile Alves, ao Vanderlan Warlington e Daniele Timbó pela companhia, grande ajuda e momentos de descontração.

A Lauana, por ser essa pessoa sempre prestativa.

Ao Thiago Sampaio, muito obrigada pelos ensinamentos e grande ajuda.

Ao João Ricardo que também muito me ajudou com sua sabedoria nas atividades do laboratório.

A Osmarilda, Dona Helena e Nóbrega muito obrigada pelo auxílio profissional.

A Dalva Alana pela amizade e carisma.

Ao Leandro, Eduardo Luís, funcionários do setor leiteiro da Embrapa, muito obrigada!

A todos os bolsistas e funcionários da Embrapa.

A Dra. Edmara Chaves e profa. Dra. Lucia de Fátima, obrigada pela colaboração.

Aos que fazem parte do LABOVIR, Danilo Saraiva, Kelma Costa, Gabrielle Rosembli, D'ávila Aguiar, Rebeca Marinho, Igor Ciríaco, Victor Manuel, Allan Bezerra, Rosivaldo Júnior, Steffi Araújo, Expedito Maia e Elysângella, obrigada pela amizade e auxílio.

Aos colegas de mestrado e aos professores do PPGCV muito obrigada pelos grandes ensinamentos.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar um programa de controle da CAE, em rebanho leiteiro, utilizando testes sorológicos. Para tanto, foram padronizadas as técnicas de Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i) e *Western Blot* (WB) a fim de diagnosticar precocemente anticorpos contra o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV). A partir das padronizações realizou-se 222 amostras de soro caprino, as quais também foram avaliadas comparativamente com a prova de rotina, Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). Os testes de WB/IDGA, Elisa-i/IDGA e WB/Elisa-i foram comparados estatisticamente, tendo apresentado sensibilidade de 100%, 70% e 84,6% e concordância de 73,9%, 90,1%, e 72,5%, concomitantemente. Desta forma, essas três técnicas foram utilizadas para o acompanhamento de animais leiteiros com práticas de manejo a fim de controlar a enfermidade. Foram realizadas sete coletas de sangue a cada quatro meses em matrizes e reprodutores, utilizando os testes de IDGA, Elisa-i e WB. As crias que tiveram parto assistido foram submetidas a coletas de sangue logo após o nascimento. Um total de 283 amostras de soro de neonatos foi analisado pelas técnicas de IDGA e WB. A prevalência dos animais adultos foi de 6,8%, 14,9% e 39,2% respectivamente por IDGA, Elisa-i e WB. Na última análise detectou-se 1,9% no teste de IDGA e 7,5% nos testes de Elisa-i e de WB. Dos 283 neonatos avaliados ao nascimento, quatro apresentaram resultado positivo no teste de WB. Esses dados revelam que os testes de Elisa-i e WB apresentaram melhores resultados quando comparados a IDGA, sendo mais sensíveis. O WB por sua vez se destacou como o método mais sensível para o diagnóstico precoce de anticorpos anti-CAEV, porém as medidas de manejo aliadas as provas sorológicas adotadas não foram suficientes para erradicar a CAE, mas favoreceu uma redução significativa de animais soropositivos no rebanho estudado. Além disso, apesar da baixa frequência a transmissão vertical dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), ocorre.

Palavras-chave: CAEV, controle, diagnóstico, Lentivírus de Pequenos Ruminantes.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate a control program of CAE, in dairy herd, using serological tests. For this, techniques of Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot (WB) were standardized to diagnose early antibodies the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). From the patterning were tested 222 goat serum samples, which were also evaluated by the test routine agarose gel immunodiffusion (AGID) for comparison. Tests for WB/IDGA, ELISA/IDGA and WB/ELISA were compared statistically, and presented a sensitivity of 100%, 70% and 84.6% and concordance of 73.9%, 90.1%, and 72.5% concomitantly. Thus, these three techniques were used for tracking dairy animals with management practices control of disease. Seven surveys serological were realized, every four months, with collected samples blood the bucks and matrices, using the AGID tests, Elisa-i and WB. The kids who had delivery assisted were subjected to blood draws, shortly after birth, 283 serum samples were analyzed by the AGID and WB. The prevalence of adult animals was 6.8%, 14.9% and 39.2%, respectively, for AGID, ELISA and WB. In the final analysis detected 1.9% in test AGID and 7.5% in tests ELISA and WB. Of the 283 newborns evaluated the birth, four were positive in the WB. These data show that the tests of ELISA and WB shows better results when compared to AGID, being more sensitive. The WB in turn stood out as the most sensitive method for early diagnosis of the disease, but the management practices adopted allied with serologic tests were not sufficient to eradicate CAE, but favored to a significant reduction of the disease in the herd studied. Furthermore, despite the low frequency the vertical transmission of Small Ruminant Lentivirus (SRLV) occurs.

Keywords: CAEV, control, diagnostic, small ruminant lentivirus.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Estrutura esquemática dos LVPR (Borderías, 2004).....	22
Figura 2 - RNA genômico do vírus da Artrite Encefalite Caprina (Olsen, 2001).....	23
Figura 3 - Aumento de volume articular em caprino infectado com o CAEV.....	25
Figura 4 - Mastite causada pelo vírus da CAE.	26
Figura 5 - Teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) realizado em placas de petri e em lâminas de microscopia, orifícios preenchido com soro controle positivo, soros teste e com antígeno para CAE.	29
Figura 6 - Linhas de precipitação do teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) realizado com antígeno para CAE.	29
Figura 7 - Teste de Elisa indireto realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos em placa rígida.	31
Figura 8 - Teste de <i>Western Blot</i> (WB) realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, padrão de proteínas, controle positivo, controle negativo e soros testes. Amostra positiva apresenta reação do mesmo peso molecular do padrão (seta).	32
Figura 9 - Separação da cria ao nascimento.	35
Figura 10 - Fornecimento de colostro termizado em cabrito recém-nascido.	35
Figura 11 - Animal positivo identificado com brinco e colar.	36

CAPÍTULO I

Figura 1 - Padronização do <i>Western Blot</i> para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina.....	48
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1 - Percentual de animais positivos detectados por IDGA, Elisa-i e WB em sete levantamentos, com intervalo de quatro meses, em rebanho leiteiro semi-intensivo.....	61
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de Elisa-i e IDGA para detecção de anticorpos contra CAEV. 49

Tabela 2 - Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de WB e IDGA para detecção de anticorpos contra CAEV. 50

Tabela 3 - Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de WB e Elisa-i para detecção de anticorpos contra CAEV. 50

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Testes de IDGA e WB em cabritos imediatamente após o nascimento.64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Ampère

Ag - Antígeno

AIEV - Vírus da Anemia Infecciosa Equina

BIV - Vírus da Imunodeficiência Bovina

CA - Capsídeo

CAE - Artrite Encefalite Caprina

CAEV - Vírus da Artrite Encefalite Caprina

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CE - Ceará

CEUA - Comitê de Ética para Uso de Animais

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DAB - Diaminobenzidine

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dUTPase - Enzima codificada pelo gene *pol*

EDTA - Acido etilenodiaminatetraacetico

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Elisa-i - Ensaio Imunoenzimático Indireto

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

env - Gene que codifica as proteínas do envelope viral

FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina

FUNCAP - Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

gag - Gene viral que codifica as proteínas interna do vírus

GP – Glicoproteína

HCl – Ácido Clorídrico

H₂O₂ - Água Oxigenada
H₂SO₄ - Ácido Sulfúrico
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA - Imunodifusão em Gel de Agarose
IgG - Imunoglobulina G
IN - Integrase
JDV – Vírus da Doença de Jembrana
KDa - Kilodaltons
LABOVIR - Laboratório de Virologia
LTR - Sequências Longas Repetidas
LVC – Lentivírus Caprino
LVPR - Lentivírus de Pequenos Ruminantes
M - Molar
MA - Matriz
mg - Miligramas
MIN - Minuto
mL - Mililitros
mM - mili-molar
MN – Membrana de Nitrocelulose
MSC - Membrana Sinovial Caprina
MVV - Vírus Maedi-Visna
Na₂CO₃ - Carbonato de Sódio
NaCl - Cloreto de Sódio
NaHCO₃ - Bicarbonato de Sódio
NA₂HPO₄ – Fosfato de Sódio Dibásico

NAH₂PO₄ – Fosfato de Sódio Monobásico

NC - Nucleocapsídeo

nm - Nanômetro

°C - Graus Celsius

ORF - Pequena região do genoma viral

OIE - Organização Mundial de Saúde Animal

OPD - O-phenylenidiamine

PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBS - Solução de Tampão de Fosfato

PBS-T - PBS-Tween-20

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PEG - Polietilenoglicol

pH - Potencial de Hidrogênio

PM - Peso Molecular

PMSF - *Phenylmethylsulphonyl fluoride*

pol - Gene encontrado no genoma retroviral que codifica a transcriptase reversa

PP - Percentual de Positividade

PPGCV - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

PR – Protease

rev - Gene de regulação viral

RNA - Ácido ribonucleico

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SFB - Soro fetal bovino

SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia

SN - Sobrenadante

SU - Glicoproteína de Superfície

tat - Gene de regulação viral

TI – Tampão de Incubação

TM - Glicoproteína Transmembrânica

tm - Trademark

TNE - Tampão Tris -HCl

TR – Transcriptase Reversa

UCCS - Ultracentrifugação em Colchão de Sacarose

UECE - Universidade Estadual do Ceará

V - Volts

vif - Gene de regulação viral

VPN - Valor Preditivo Negativo

VPP - Valor Preditivo Positivo

W - Watts

WB - *Western Blot*

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm – Micrômetro

g - Unidade da força centrífuga relativa

χ^2 - Qui-Quadrado

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 VISÃO GERAL DA CAPRINOCULTURA	20
2.2 VÍRUS DA ATRITE ENCEFALITE CAPRINA	21
2.2.1 Classificação, morfologia e genoma	21
2.2.2 Replicação	23
2.2.3 Resposta imune	24
2.2.4 Sinais clínicos.....	25
2.2.5 Transmissão.....	27
2.2.6 Diagnóstico.....	28
2.2.6.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)	28
2.2.6.2 Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i).....	30
2.2.6.3 <i>Western Blot</i> (WB)	31
2.2.6.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	32
2.2.6.5 Isolamento viral	33
2.2.7 Tratamento	33
2.2.8 Medidas de prevenção e controle	33
3 JUSTIFICATIVA	38
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	39
5 OBJETIVOS	40
5.1 OBJETIVO GERAL	40
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
6 CAPÍTULO I	41
PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO E WESTERN BLOT PARA DIAGNÓSTICO DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	52
AGRADECIMENTOS	52

REFERÊNCIAS	52
7 CAPÍTULO II.....	55
UTILIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS COMO FERRAMENTAS PARA CONTROLE DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA EM REBANHO LEITEIRO	56
RESUMO	56
ABSTRACT	57
INTRODUÇÃO.....	57
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	67
AGRADECIMENTOS	68
REFERÊNCIAS	68
8 CONCLUSÕES.....	72
9 PERSPECTIVAS.....	73
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	86
ANEXO 1 - DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	87
ANEXO 2 - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO	88

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) se enquadra no grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) e necessita de vigilância devido à sua dispersão mundial. É uma doença multissistêmica crônica, com um longo período de incubação e evolução clínica lenta e progressiva (Franke, 1998). Além de ser incurável, pode ainda se apresentar de forma assintomática em muitos animais, tornando estes portadores do vírus, o que favorece a disseminação da enfermidade.

Caprinos infectados com o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) podem apresentar lesões nas articulações, pulmões, sistema nervoso e glândula mamária. Entretanto, a que tem grande impacto econômico é a forma mamária, porque compromete a produção leiteira e a qualidade do leite, por aumentar a contagem de células somáticas e diminuir os níveis de gordura do leite (Greenwood, 1995; Brito, 2009; Carneiro, 2011). Esse vírus afeta caprinos de qualquer raça, sexo e faixa etária, tendo sido observada uma crescente soroprevalência com o avançar da idade (Jones et al., 2000; Pinheiro et al., 2001; Radostits et al., 2002; Souza et al., 2005).

A dispersão do CAEV vem causando diversas perdas, como a diminuição da vida produtiva, predisposição para a ocorrência de infecções bacterianas, sobretudo na glândula mamária, crescimento deficiente ou aumento da taxa de mortalidade das crias e diminuição da eficiência reprodutiva (Brito, 2009; Carneiro, 2011).

Há uma grande preocupação de melhorar o controle dessa enfermidade, especialmente em rebanhos leiteiros onde o índice de casos é mais elevado. Isso se deve pela contaminação de crias por meio do colostro e leite de animais positivos, sendo a via digestiva a principal fonte de transmissão natural do CAEV (Mselli-Lakhal et al., 1999; Lamara et al., 2001). Além desta, outras vias de infecção como secreções salivares, respiratórias, intrauterina e sexual, também têm sido estudadas (Blacklaws et al., 2004; Peterhans et al., 2004; Souza et al., 2012a).

O sucesso do controle depende de boas técnicas de manejo, no qual visam à prevenção da transmissão pelo leite, isolamento dos animais soropositivos (East, 1993), e de testes diagnósticos mais sensíveis (Pinheiro et al., 2010). Para isso, a sorologia representa uma forma eficaz no diagnóstico laboratorial, pois a presença de anticorpos demonstra indiretamente a existência de infecção (Castro, 1998). O diagnóstico mais

rotineiramente utilizado é o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), porém outros testes sorológicos como o ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-i) e o *Western Blotting* (WB) também são empregados.

A IDGA é indicada como teste de triagem, porque é de fácil execução e tem alta especificidade (Varea et al., 2001). Sua desvantagem é a sororreação tardia, pois só detecta altos níveis de anticorpos. O teste Elisa-i é considerado mais sensível que o IDGA, porém a sensibilidade e especificidade do teste depende da qualidade do antígeno. Já o WB é considerado padrão ouro para validação de outros testes, entretanto é uma técnica bastante laboriosa (Zanoni et al., 1989)

A implantação de testes laboratoriais e boas práticas de manejo para controlar a CAE são necessárias, pois ainda não existem tratamentos nem vacinas eficazes contra essa enfermidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Visão geral da caprinocultura

A região Nordeste é o local de maior concentração de caprinos, correspondendo a 90,61% de animais do rebanho nacional, sendo os Estados da Bahia, Pernambuco, Piauí, Ceará e Paraíba os que representam os maiores efetivos de caprinos (IBGE, 2009).

No entanto, o desempenho da caprinocultura nessa região é comprometido por práticas comumente inadequadas de manejo alimentar, reprodutivo e sanitário, bem como pela ausência de escrituração zootécnica e diagnóstico tardio de diversas doenças com etiologias diferentes, e que em sua maioria não são controladas de maneira apropriada (Pinheiro et al., 2003; Brito, 2009; Carneiro, 2011).

A caprinocultura merece uma maior atenção a respeito da situação sanitária desses animais, necessitando de maiores cuidados, o que pode repercutir na associação do valor aos animais e seus produtos (Castro e Melo, 2001). Um dos problemas sanitários de relevância é a síndrome da Artrite Encefalite Caprina (CAE) (Silva et al., 1996). Essa doença é determinada pela infecção com o CAEV.

A introdução da CAE na América do Sul ocorreu, possivelmente através das importações de animais de raças leiteiras estrangeiras, provenientes de rebanhos europeus (França, Suíça, Alemanha, Holanda, Inglaterra) e americanos (Estados Unidos e Canadá). Sua primeira descrição no Brasil foi feita no Rio Grande do Sul, com identificação de caprinos soropositivos (Moojen et al., 1986). Há também registros de exames positivos em soros coletados, no Rio de Janeiro, no início da década de 80 (Cunha e Nascimento, 1995). Posteriormente sua presença foi confirmada com o isolamento do vírus de caprinos (Castro et al., 1999; Feitosa et al., 2007).

A disseminação do CAEV vem sendo difundida mundialmente, principalmente em países que praticam a caprinocultura leiteira intensiva (Crawford et al., 1981; East et al., 1987), necessitando assim de constante vigilância.

2.2 Vírus da Atrite Encefalite Caprina

2.2.1 Classificação, morfologia e genoma

O vírus da Atrite Encefalite Caprina (CAEV) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivirus* (lenti em latim = lento) (Crawford et al., 1980). Competem também a este gênero, o vírus Maedi-Visna (MVV), os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2), vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) (Haase, 1986; Clements e Payne, 1994) e o vírus da doença de Jembrana (JDV) (Burkala et al., 1998). No entanto, os dois principais grupos filogenéticos dos Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) estão representados pelos protótipos do CAEV e MVV (Shah et al., 2004).

Esses infectam caprinos e ovinos, respectivamente. São considerados patógenos espécie-específicos, porém estudos evidenciaram que são capazes de contaminar ambas as espécies (Pisoni et al., 2005; Ravazzolo et al., 2006; Souza et al., 2012a).

A estrutura desses Lentivirus é de vírions envelopados de 80 a 100 nm de diâmetro contendo duas moléculas idênticas de RNA e proteínas estruturais (figura 1) (Gonda et al., 1986; Joag et al., 1996; Jones et al., 2000). A porção viral mais externa é ligeiramente esférica constituída por lipídios, onde se encontram inseridas diversas glicoproteínas codificadas pelo vírus, apresentando ainda uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície, os quais promovem uma resistência à degradação do vírus pelas enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal, o que possibilita a infecção intestinal e facilita seu escape do controle humoral (Huso et al., 1988).

Os três principais genes do genoma são expressos por gene *gag*, *env*, *pol*. As glicoproteínas do gene *env* (envelope) são glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranar (TM) que atuam na penetração do vírus nas células. O núcleo é cônico e denso (Joag et al., 1996; Jones et al., 2000), o qual se constitui por produtos do gene *gag* (antígeno grupo-específico) – proteínas do capsídeo (CA), nucleocapsídeo (NC) e matriz (MA). A região *pol* (polimerase) codifica as proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa, protease, integrase e dUTPase, além de pequenos ORFs (“*open reading frames*”) ou fases abertas de leitura, que codificam proteínas que regulam a

expressão gênica como os genes acessórios (*tat*, *vif*), (ou Q) e (*rev*), codificantes de proteínas de regulação da expressão viral (Clements e Payne, 1994).

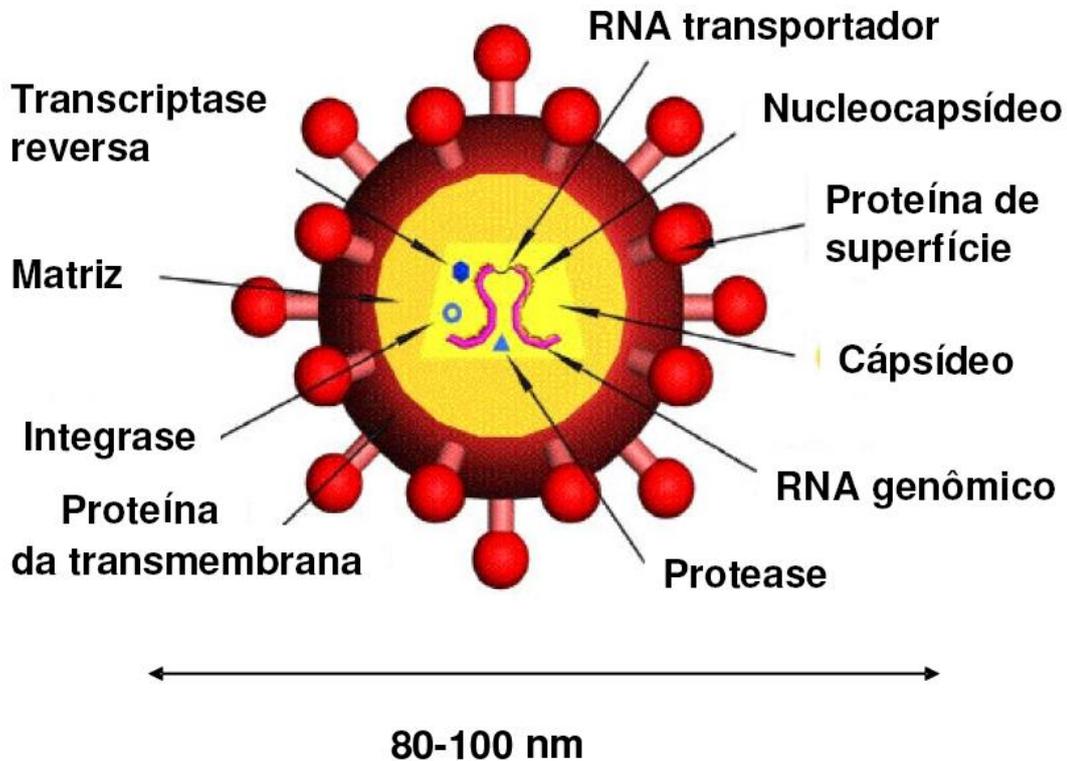


Figura 1 - Estrutura esquemática dos LVPR (Borderías, 2004).

O genoma viral possui tamanho de aproximadamente 10Kb, formado por duas regiões terminais não codificantes (sequências longas repetidas ou “LTRs”), localizadas nas extremidades 5’ e 3’, as quais estão envolvidas na habilidade do vírus em sofrer replicação em células distintas, contribuindo para o estabelecimento do tropismo celular (Agnarsdóttir et al., 2000; Clements e Payne, 1994). Entre essas regiões extremas estão os genes *gag* e *pol*, que são considerados os mais conservados, e o gene *env* que é bastante heterogêneo (Narayan e Clements, 1989). Além desses, o gene acessório *tat*, que é essencial para a indução da patogenicidade, e *rev* e *vif*, os quais participam da replicação viral (figura 2) (Harmache et al., 1995; Clements e Zink, 1996; Joag, 1996).

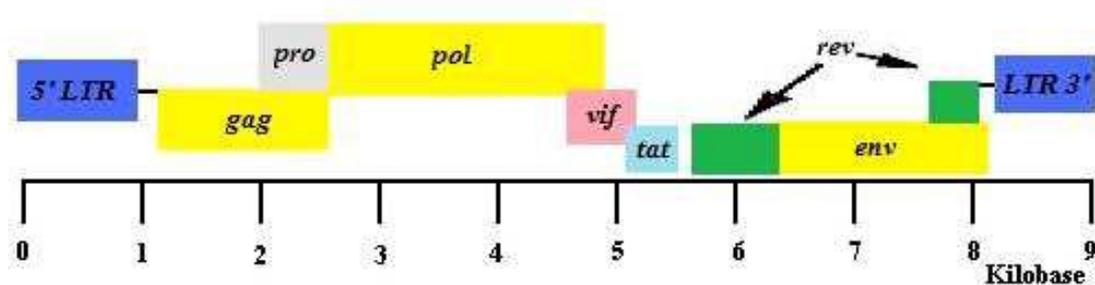


Figura 2 - RNA genômico do vírus da Artrite Encefalite Caprina (Olsen, 2001).

2.2.2 Replicação

O vírus possui tropismo principalmente pelas células do sistema monocítico-fagocitário que proporcionam a replicação viral e funcionam como meio de distribuição. A “replicação restrita” permite que o vírus permaneça latente nos monócitos do hospedeiro e não seja detectável pelo sistema imune (Pugh, 2004). A replicação geralmente é limitada por determinados fatores, entre os quais se destaca a restrição que é mediada por interferon, produzido por linfócitos ativados durante sua interação com os macrófagos infectados. 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 (Pinheiro, 2001).

O lentivirus compartilham três características gerais que promovem a persistência da infecção em seus hospedeiros. Primeiro, após a transcrição reversa do RNA viral nas células infectadas, o DNA proviral se integra ao genoma celular, permitindo que o vírus escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro e preserve o seu genoma. Segundo, se multiplicam em células do sistema imunológico, normalmente responsáveis pela eliminação de células infectadas, assim, o hospedeiro não consegue desenvolver resposta imunológica curativa (Narayan et al., 1997, Callado et al., 1999).

Terceiro, esses vírus acumulam altas taxas de mutação durante o processo de replicação, devido a falhas da transcriptase reversa em corrigir as novas sequências de nucleotídeos, resultando em variabilidade genética e, conseqüentemente fenotípica. Além disso, a restrição da expressão viral, sem produção de partículas virais, permite

que as células infectadas pelo vírus escapem do sistema imunológico do hospedeiro (Cheevers et al., 1993; Narayan et al., 1997).

2.2.3 Resposta imune

O CAEV está associado covalentemente com as glicoproteínas TM, denominada de gp 45, e de SU gp135; com o CA cuja proteína é a p28, com peso molecular em torno de 28 a 30 KDa; com o NC, que é uma pequena proteína que interage com o RNA do vírus e MA, que está situada entre o CA e o envelope, possuindo proteína com peso de cerca de 16 KDa (p16). É contra a proteína do CA que ocorre a primeira resposta imune detectada em torno da terceira semana após infecção e por volta da quinta semana são produzidos anticorpos para as proteínas do NC, MA, TM e SU (Concha-bermejillo et al., 1995; Pepin et al., 1998; Hirsh e Zee, 2003).

Dentre as proteínas citadas, duas estão mais diretamente envolvidas com a produção de anticorpos pelo hospedeiro: uma glicoproteína do envelope, de peso molecular de 135 kDa (gp135), e uma nucleoproteína de peso molecular de 28 kDa (p28) (Gogolewski et al., 1985; Johnson et al., 1983; Knowles et al., 1991).

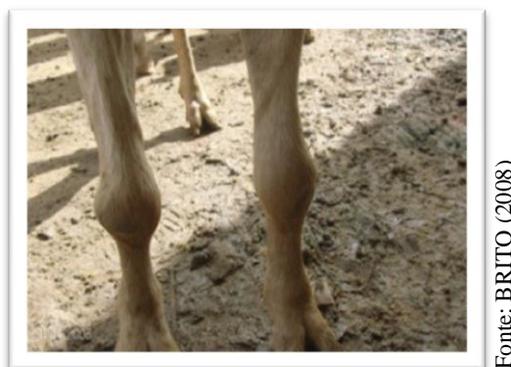
A resposta celular é caracterizada pela proliferação de linfócitos T CD4+ (Reyburn et al., 1992b) e T CD8+ (Lichtensteiger et al., 1993; Blacklaws et al., 1994) que são responsáveis pela destruição de células infectadas, porém não destroem as que não expressam as proteínas víricas. Os anticorpos passivos adquiridos pela ingestão de colostro persistem em níveis detectáveis no soro de cabritos por menos de seis meses (Adams et al., 1983; Cutlip et al., 1988).

O alto grau de variabilidade genética do vírus, como evidenciado pela geração de uma população altamente divergente de genoma viral nos indivíduos infectados pode ser relatado como um dos fatores da persistência viral (Clements et al., 1988). Estas variantes escapam da ação do sistema de defesa do hospedeiro (Knowles et al., 1990). E o vírus é capaz de replicar-se independentemente da síntese de DNA celular, fazendo com que a célula o hospede por longos períodos (Klevjer-Anderson e Cheeveres, 1981).

2.2.4 Sinais clínicos

A presença de lesões nas articulações, pulmão, sistema nervoso e glândula mamária são indicativos à infecção por Artrite Encefalite Caprina. Mesmo o CAEV causando infecções persistentes, os animais podem não apresentar sintomatologias. Porém em aproximadamente um terço desses, há um progresso para uma ação inflamatória degenerativa nesses órgãos-alvo, causando perda de peso e debilidade até a morte (Pisoni et al., 2007).

A forma articular, por ser mais comum, é considerada a mais importante, geralmente observada em animais com mais de oito meses de idade. Com o avançar da enfermidade o animal apresenta aumento de volume da articulação (figura 3), claudicação intensa e dificuldade de locomoção. As articulações cárpicas são as mais afetadas, já as do jarrete, a patelar e a atlanto-occipital são acometidas com menor frequência (Crawford e Adams, 1981; Oliver et al., 1981; Gonzalez et al., 1987; Cutlip et al., 1988).



Fonte: BRITO (2008)

Figura 3 - Aumento de volume articular em caprino infectado com o CAEV.

Quanto à apresentação pulmonar é bastante rara e de pouca gravidade. Os sintomas são tosse, dispnéia após exercícios físicos, taquipnéia, consolidação pulmonar, som úmido à auscultação e comprometimento do estado geral (Narayan e Cork, 1985, Cutlip et al., 1988; Pereira, 1995).

A sintomatologia nervosa da CAE ocorre mais frequentemente em crias e, ocasionalmente em adultos. Os sinais incluem ataxia secundária uni ou bilateral. Neste estágio os cabritos apresentam dificuldade em abduzir os membros posteriores, que

progredir para uma paralisia ascendente e paresia total dos posteriores, evoluindo para tetraplegia. Com a evolução da enfermidade, os cabritos se tornam cegos, apresentam rotação, desvio e balanceios de cabeça, que pode se manter voltada para cima ou em outra posição, paralisia facial e opistótono (Radostits et al., 2002; Pugh, 2004).

Na forma mamária as cabras podem desenvolver mastite aguda ou crônica (Figura 4). Essa se instala durante a lactação e caracteriza-se por uma mastite intersticial com endurecimento do úbere, em que a consistência da glândula mamária apresenta-se dura à palpação, embora o aspecto do leite esteja aparentemente normal. Aquela por sua vez é observada no início da lactogênese, ocorrendo um endurecimento não edematoso do órgão, com baixa ou nenhuma produção leiteira (Peretz et al., 1993, Lara et al., 2005).



Figura 4 - Mastite causada pelo vírus da CAE.

Essa forma clínica traz grande preocupação ao caprinocultor, pois o CAEV está diretamente relacionado com a produção leiteira na qual diminui significativamente (Konishi et al., 2011). Além disto, o vírus pode indiretamente reduzir os níveis de gordura do leite. Como este componente está ligado à ingestão de forragem, foi observado que cabras com aumento no índice articular apresentam dificuldade em pastejar e produziram leite com menos gordura e conseqüentemente menos sólidos totais (Brito, 2009).

2.2.5 Transmissão

Pesquisas para elucidar as formas de transmissão do CAEV vêm sendo largamente estudadas a fim de estabelecer eficientes programas de controle das lentiviroses de caprinos e ovinos (Pinheiro, 2001).

A transmissão do CAEV pode ser classificada de duas formas, vertical ou horizontal direta e indireta (Blacklaws et al., 2004). A forma horizontal pode ser intensificada em rebanhos infectados quando se aumenta a concentração de animais, pois quanto maior a aproximação desses animais maior a probabilidade de contato com secreções contendo macrófagos ou monócitos infectados (Narayan et al., 1983).

Materiais como sangue, leite ou colostro contem células do sistema mononuclear-fagocitário e são comumente analisados por serem vias passíveis de infecção. Além dessas células, as células epiteliais, presentes nas secreções lácteas cuja infecção pelos lentivírus pode ocorrer *in vitro* e *in vivo* podem contribuir para transmissão da infecção aos animais lactentes (Mselli-Lakhal et al., 1999). As células endoteliais e células do fibroblasto também são permissivas à infecção *in vivo* (Carrozza et al., 2003).

A transmissão horizontal ocorre pelo contato com fluídos nasais e orais contendo os vírus ou células infectadas (Zink e Johnson, 1994). A principal fonte de transmissão da enfermidade é por meio da via digestiva com ingestão do colostro e/ou leite de cabras infectadas (Rowe et al., 1992).

A transmissão de forma vertical pode ocorrer, por via transplacentária ou intrauterina, visto que o vírus está presente no fluido uterino (Andrioli, 2001). O DNA pró-viral também foi detectado no oviduto e ovário (Fieni et al., 2003), nas células do *cumulus oophorus* (Ali Al Ahamad et al., 2005) em células do córtex ovariano, folículos pré-antrais (Silva, 2006), em sêmen (Andrioli et al., 1999; Travassos et al., 1999; Paula et al., 2009), como também no canal vaginal, neste último caso possibilitando a ingestão de fluidos maternos contaminados pela cria (Adams et al., 1983; Ellis et al., 1986; East et al., 1993).

Diante das formas de transmissão já estabelecidas a implantação de programas de controle baseados somente na transmissão por leite e colostro entre a mãe infectada e sua prole são limitados, necessitando da adição de outros métodos de controle que considerem um maior espectro de vias de infecção (Pinheiro et al., 2001a).

2.2.6 Diagnóstico

É possível observar que muitos animais infectados não apresentam sintomatologia clínica, porém permanecem soropositivos durante toda a sua existência (Cutlip et al., 1992). Os exames clínicos não são suficientes para detectar um animal como positivo para CAE, o que também pode ser confundido com outras enfermidades. Devido a isso é necessário a realização de testes laboratoriais (Oliveira, 2006).

Caprinos infectados podem ser detectados com base na presença de anticorpos antivirais no soro, pela detecção de proteínas ou do ácido nucléico, além do isolamento viral (Demartini et al., 1999). Devido à praticidade na coleta de amostras e baixo custo, a detecção de anticorpos é o método mais empregado para diagnosticar a infecção (Knowles, 1997). No entanto, a resposta de anticorpo em cada caprino infectado pelo CAEV varia ao longo do tempo, e muitos animais infectados mostram sororeação intermitente ou um atraso na soroconversão após a infecção (Mackenzie et al., 1987; Rimstad et al., 1993; Hanson et al., 1996), havendo a necessidade de provas sorológicas sensíveis para obtenção de um diagnóstico precoce.

Dentre as técnicas laboratoriais, os métodos de diagnósticos indiretos (sorológicos) podem ser realizados por meio das técnicas de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i) e *Western Blot* (WB), e os métodos diretos podem ser aplicados pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e isolamento viral.

2.2.6.1 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

O IDGA possui alta especificidade, sendo considerado como padrão no diagnóstico de triagem (Varea et al., 2001). É o método mais utilizado para a detecção de anticorpos contra os lentivírus e caracteriza-se por ser barato e de fácil aplicabilidade no campo (Pinheiro et al., 2006a).

A técnica baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo que se insolubilizam e precipitam no gel, em uma placa de Petri ou em uma lâmina de microscopia (figura 5), onde se desenvolve a linha de precipitação visível entre os

orifícios no ponto em que é alcançada a relação ótima entre antígeno e anticorpo (figura 6) (Roitt et al., 1998; Tortora et al., 2000).

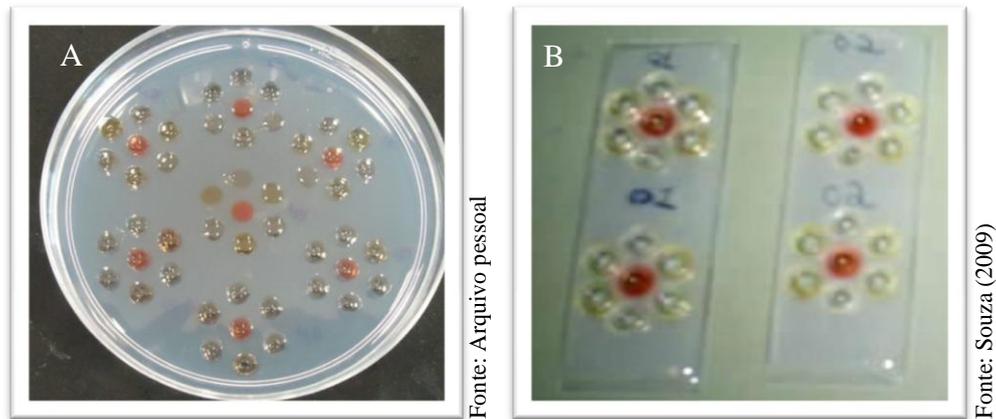


Figura 5 - Teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) realizado em placas de petri e em lâminas de microscopia, orifícios preenchido com soro controle positivo, soros teste e com antígeno para CAE.

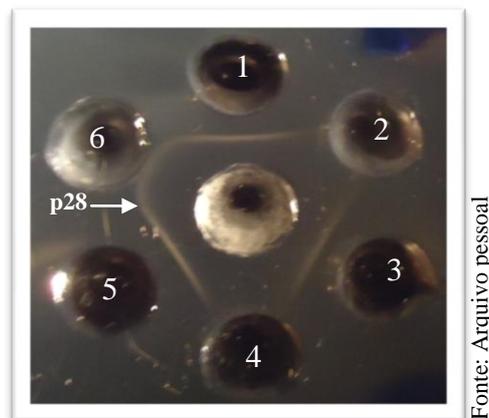


Figura 6 - Linhas de precipitação do teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) realizado com antígeno para CAE.

Um resultado negativo no IDGA não descarta uma possível infecção, pois pode ocorrer uma demora significativa entre a infecção e a produção de anticorpos, como também pode acontecer que em alguns caprinos acometidos exista expressão insuficiente do vírus para ocasionar uma resposta humoral (Mcguire et al., 1990; Hanson et al., 1996). Assim a grande desvantagem desse teste, é detectar somente altos

níveis de imunoglobulinas, o que permite a ocorrência de falso-negativos no rebanho (Andrioli et al., 2006a; Tigre et al., 2006).

Para o monitoramento de um rebanho essa técnica é importante para verificar a presença do agente infeccioso. De acordo com os dados de Pinheiro et al. (2001a) a prevalência da CAE em rebanhos leiteiros no Estado do Ceará foi de 4,6% (37/810), já Sobrinho et al. (2009) relatou que a prevalência no Estado de Tocantins foi de 2,7% (23/843) de animais positivos. Esses dados confirmam que essa enfermidade encontra-se disseminada em todo território brasileiro, indicando, portanto a importância da necessidade da implantação de medidas de controle das lentivirose.

2.2.6.2 Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i)

O IDGA e Elisa-i são os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal para o diagnóstico sorológico de infecção por LVPR (OIE 2006). O Elisa-i é usado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro a partir da utilização de anti-anticorpos marcados com enzimas (figura 7). A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (Madruça et al., 2001). É considerado um teste bastante sensível que requer cuidados quanto à padronização da técnica.

Recentemente, foi demonstrado que o Elisa-i pode ser realizado com antígeno produzido por microfiltração seriada com uso do sistema de filtração AMICON, para separação da porção referente à proteína p28 do capsídeo, no qual mostrou-se além do custo reduzido uma alta sensibilidade e boa especificidade, podendo ser comparado com outros kits de diagnóstico Elisa-i disponíveis para comercialização nacional e internacional (Alves et al., 2012)

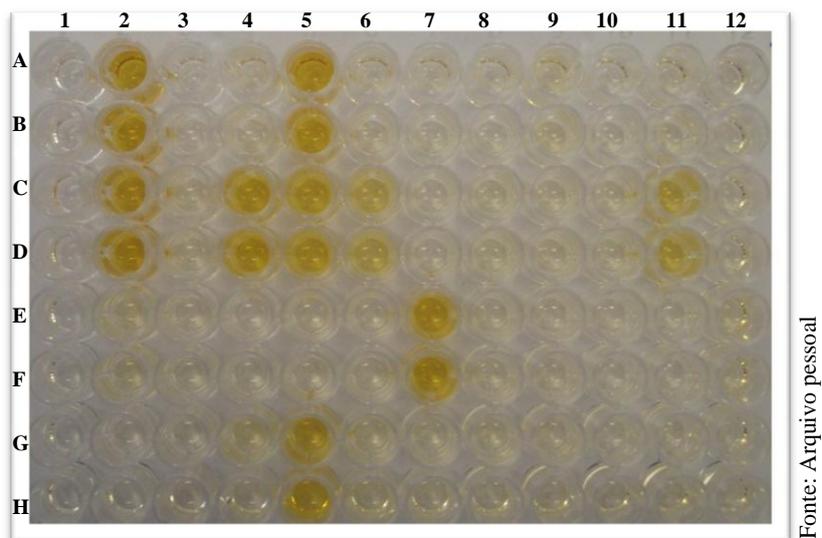


Figura 7 - Teste de Elisa indireto realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos em placa rígida.

Ao comparar ELISA e IDGA verificou-se que a técnica de ELISA detectou animais com baixos níveis de anticorpos o que não ocorreu com a IDGA. O ELISA obteve assim uma sensibilidade de 93,93% e especificidade de 100%. A concordância entre os testes foi de 97,43%, demonstrando um bom desempenho. Ainda assim, cogita-se a necessidade de mais estudos para o desenvolvimento de técnicas de diagnósticos mais eficazes para facilitar a identificação da CAEV e possibilitar maior identificação de focos de infecção no rebanho nacional (Cruz et al., 2009).

2.2.6.3 Western Blot (WB)

A técnica de WB consiste na imunodeteção de proteínas em filtro de nitrocelulose pela reação com anticorpos específicos desenvolvidos para reconhecer o polipeptídeo em exame. O anticorpo específico é adicionado à membrana e deixado reagir por certo período de tempo, após o qual uma fração de anticorpo fica retida na região da membrana que contém o polipeptídeo específico (Brígido, 2003).

Esse anticorpo adsorvido especificamente sobre o polipeptídeo é detectado com um anti-soro, ou seja, um anticorpo anti-anticorpo específico (conhecido também de segundo anticorpo ou conjugado) que foi quimicamente modificado pelo acoplamento covalente de uma ou mais moléculas de uma enzima. Esse reagente serve para detectar

o anticorpo específico e permite a sua visualização em razão da atividade enzimática associada (figura 8). Devido à utilização de anticorpos acoplados a enzimas e substratos sintéticos coloridos, esse teste é também conhecido como ensaio imunoenzimático (Brígido, 2003).



Figura 8 - Teste de *Western Blot* (WB) realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, padrão de proteínas, controle positivo, controle negativo e soros testes. Amostra positiva apresenta reação do mesmo peso molecular do padrão (seta).

O WB é classificado como teste complementar, sendo denominado padrão ouro na validação de outros testes. Apresenta como vantagem menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos (Zanoni et al., 1989). O seu alto custo e a necessidade de um tempo mais extenso para obtenção do resultado são desvantagens em relação às outras técnicas.

2.2.6.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Métodos de diagnósticos diretos podem ser aplicados por meio da técnica de Reação em cadeia de polimerase (PCR) na qual permite a identificação por amplificação direta de parte específica do ácido nucléico viral contido em fluidos e tecidos de um animal infectado (Pinheiro, 2001). É capaz de detectar animais com infecção recente ou que ainda não soroconverteram, além de detectar microrganismos

em estado latente, mortos ou que estejam unidos ao material genético do hospedeiro, porém é uma técnica que requer equipamentos especiais e técnicos qualificados (Andrioli et al., 2006b; Tigre et al., 2006).

2.2.6.5 Isolamento viral

É aplicável ao diagnóstico de quase todas as viroses de interesse veterinário inclusive da CAE, com capacidade de detectar quantidades mínimas de vírus, sendo considerado um teste padrão de diagnóstico em virologia. Existem, no entanto, algumas restrições, uma vez que é uma técnica demorada, dispendiosa, necessita da implantação de cultivos celulares especiais e, além disso, é incapaz de detectar vírus que não causem efeito citopático (Knowles, 1997; Dantas, 2004).

2.2.7 Tratamento

O princípio de vacinas virais clássicas como varíola, sarampo é evitar o desenvolvimento da doença clínica através da memória imunológica que garantirá a defesa do indivíduo vacinado. No caso dos retrovírus ainda não foi possível tais ações. Desta forma, ainda não foi relatado na literatura tratamento nem vacinas eficazes contra a CAE (Castro, 1998; Júnior et al., 2009).

2.2.8 Medidas de prevenção e controle

O controle de qualquer enfermidade baseia-se na redução da morbidade e mortalidade da doença. Esse método é também considerado um termo geral que abrange todas as medidas com as quais se deseja interferir na ocorrência ilimitada de uma doença, qualquer que seja sua causa. Pode ser alcançado por meio do tratamento de animais doentes, reduzindo a prevalência da enfermidade e pela prevenção da doença, diminuindo tanto a incidência quanto a prevalência (Done, 1985).

Para tanto, o manejo sanitário é de grande importância em qualquer sistema pecuário produtivo, pois a ausência de enfermidades evita perdas na produção. Atualmente sabe-se que as doenças crônicas são as que mais contribuem para a redução

da produtividade, impedindo que os animais atinjam a totalidade do seu potencial produtivo (Modolo et al., 2003). Portanto, em primeira análise é necessário levantar a prevalência das doenças. Nos rebanhos que apresentam uma alta prevalência deve-se reduzir esse quadro para baixa prevalência. Após essa fase, estratégias devem ser estabelecidas para erradicar a infecção no rebanho (Peterhans et al., 2004).

A ausência de meios terapêuticos para a CAE torna as práticas de manejo e as técnicas de diagnóstico os métodos recomendados para controle dessa enfermidade. No caso de rebanhos leiteiros a vigilância é mais complexa e trabalhosa principalmente por que os animais permanecem mais tempo em contato direto uns com os outros do que em sistemas de criação extensivos (Joag et al., 1996). No entanto, uma das formas mais importantes de controle se dá pelo correto manejo das crias após o parto, a fim de se evitar a transmissão pelo colostro e/ou leite de cabras infectadas (Radostits et al., 2002).

Aproximadamente 69% das infecções pelo CAEV ocorrem pela ingestão de leite ou colostro contaminado e os 31% restantes devem ser creditadas a outras vias de infecção (Rowe et al., 1991). Além das células do sistema monócito-fagocitário que estão presentes no leite e que conhecidamente são responsáveis pela transmissão dos LVPR, as células epiteliais presentes nas secreções lácteas são permissivas à infecção pelos lentivírus *in vitro* e *in vivo*, podendo contribuir para transmissão da infecção aos animais lactentes (Mselli-Lakhal et al., 1999).

Para diminuir a disseminação do vírus em rebanhos leiteiros, os cabritos devem ser separados de suas mães logo ao nascimento (figura 9) e ser alimentados com colostro (figura 10) e leite termicamente tratados (Reilly et al., 2002). O tratamento térmico deve ser a 56°C por uma hora para inativar o vírus. Após a termização o colostro deve ser congelado e armazenado para formação de um banco, para um posterior fornecimento aos animais. Deve ser fornecido em mamadeiras individuais, à vontade, três vezes ao dia durante as primeiras 36 horas de vida (Gouveia, 1996; Bomfim et al., 2006). Alguns autores recomendam ainda o estabelecimento de um banco de colostro de vacas, pois é uma fonte rica de IgG e livre do vírus (Argüello et al., 2004).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9 - Separação da cria ao nascimento.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10 - Fornecimento de colostro termizado em cabrito recém-nascido.

Outra medida de controle é a identificação de animais soropositivos (figura 11), esses devem ser mantidos em instalações isoladas com o intuito de evitar o contato físico com os não infectados ou descartar os soropositivos do rebanho (Radostits et al., 2002). A identificação pode ser feita com o uso de cordões e utensílios de uso no manejo em cores distintas para animais soropositivos e soronegativos (Carneiro, 2011). Deve-se também impedir a entrada de animais infectados no plantel (Castro, 1998), estabelecer uma linha de ordenha onde as fêmeas soropositivas e/ou suspeitas sejam ordenhadas por último (Oliveira, 2006), realizar monta com bodes negativos ou ainda as cabras devem ser inseminadas com sêmen livres do vírus (Smith, 1993).



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 11 - Animal positivo identificado com brinco e colar.

Com a finalidade de evitar perdas de material genético provocada pelo descarte dos animais doentes, programas de controle buscam a obtenção de crias de animais enfermos antes de descartá-los (Pinheiro et al., 2001a), uma vez que o comércio de material de multiplicação animal, que em muitos casos é imprescindível para manutenção ou aumento da produtividade pecuária, não está isento de riscos (Carvalho et al., 2007). Desta forma, várias biotécnicas são utilizadas na reprodução animal, visando à preservação de sêmen, folículos ovarianos e embriões de animais geneticamente melhorados (Silva e Lima, 2007).

A detecção do DNA pró-viral do CAEV no sêmen é fundamental para o programa de controle da CAE, considerando-se o risco de transmissão por meio de infectados, utilizado em monta natural ou inseminação artificial (IA). Segundo Andrioli et al. (2006a), o dano testicular é um fator que influencia significativamente a presença do lentivírus no sêmen, e a lavagem apenas reduz a presença, mas não é suficiente para eliminá-lo.

As medidas de controle para LVPR vem sendo adotadas em vários países (Rowe et al., 1999). A Europa iniciou uma erradicação da MVV em países baixos no início da década de 80, a qual foi bem sucedida. No entanto, a Irlanda não está livre de CAEV de acordo com as estatísticas da OIE (Nuotio, 2006). Os métodos aplicados nestes programas forneceram muitas informações sobre o controle das LVPR, não somente em ovelhas, mas também em cabras. A partir de então vários outros programas similares foram desenvolvidos como na França, Itália, Alemanha, Espanha, Filândia e Suíça (Sihvonen et al., 2000).

No Japão foi realizado, durante quatro anos, um programa de erradicação contra a CAE. O programa utilizou três estratégias, primeira, remoção de cabrito imediatamente após o parto, segunda, separação de cada nova geração e terceira, abate de caprinos positivos em testes (IDGA e PCR) periódicos. O conjunto desses permitiu o estabelecimento de um rebanho livre de caprinos infectados pelo CAEV (Konishi et al., 2011). Relatos demonstram que o número de caprinos e ovinos no rebanho pode ser um fator de risco para a infecção das LVPR (Brülisauer et al., 2005). No caso do Japão, por exemplo, o número de caprinos mantidos é < 20.000 , provavelmente esse fator tenha contribuído para um melhor controle da enfermidade, o que favoreceu para que o programa terminasse com êxito.

Segundo apontamentos de Nuotio (2006), a separação de crias ao nascimento e o fornecimento de colostro termizado são ações viáveis como medidas temporárias, como por exemplo, para preservar valores genéticos. Já a aplicação de testes periódicos e o abate de animais soropositivos é praticamente a única abordagem efetiva nos rebanhos.

3 JUSTIFICATIVA

A CAE é uma enfermidade de caráter crônico e debilitante. Estudos sobre os prejuízos diretos causados por esta doença ainda são limitados, mas os resultados disponíveis indicam que, ocorrem perdas produtivas como: diminuição da produção láctea; dos níveis de gordura e de sólidos totais do leite; redução do período de lactação; crescimento deficiente ou aumento da taxa de mortalidade das crias e diminuição da eficiência reprodutiva. Além da predisposição à verminose gastrintestinal por *Haemonchus* spp. e a ocorrência de infecções bacterianas, especialmente na glândula mamária; (Greenwood, 1995; Pinheiro et al., 1999; Andrioli et al., 2003; Turin et al., 2005; Lilenbaum et al., 2007; Brito, 2009; Carneiro, 2011).

As perdas indiretas referem-se à desvalorização dos rebanhos, reposição precoce dos animais que desenvolvem sintomas, despesas com o controle, comprometimento das barreiras comerciais para matrizes, reprodutores, sêmen e embriões (Andrioli et al., 2003).

Diante das perdas mencionadas causadas pela CAE, ausência de meios terapêuticos e presença de animais assintomáticos nos rebanhos, torna-se importante a implantação de programas de controle utilizando testes de diagnósticos mais sensíveis para detecção precoce de animais soropositivos bem como o emprego de boas práticas de manejo.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Programas de controle que empregam práticas de manejo que visam inibir a propagação do vírus em rebanho infectado pela CAE aliadas as técnicas sensíveis de diagnóstico indiretas como ELISA e *Western Blot* são eficazes no controle do CAEV.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar um programa de controle da CAE, em rebanho leiteiro, utilizando testes sorológicos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar técnicas de Elisa-i e de WB;
- Comparar as técnicas de diagnóstico para Artrite Encefalite Caprina;
- Controlar a CAE em um rebanho leiteiro baseado em práticas que impeçam a propagação do CAEV e em testes periódicos de IDGA, Elisa-i e WB.
- Diagnosticar por meio de IDGA e WB se as crias recém-nascidas apresentam anticorpos anti-CAEV.
- Avaliar a transmissão transplacentária (vertical).

6 CAPÍTULO I

PADRONIZAÇÃO DO ELISA INDIRETO E *WESTERN BLOT* PARA DIAGNÓSTICO DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA

(Standardization of indirect ELISA and Western Blot for diagnosis of caprine
arthritis-encephalitis)

Periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Submetido em
outubro de 2012).

Padronização do Elisa indireto e *Western Blot* para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina

[Standardization of indirect ELISA and Western Blot for diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis]

A.S. Rodrigues¹, R.L.L. Brito², R.R. Pinheiro³, R.P. Dias¹, S.M. Alves⁴, T.S. Souza⁵, K.C. Souza¹, D.A.A. Azevedo⁴, A. Andrioli³, D.C.T. Magalhães⁶, M.F.S. Teixeira^{1*}

¹Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza, CE

* Endereço: Av. Paranjana, 1700, Fortaleza-CE, Cep: 60740-903, e-mail: labovirfavetuece@uece.br

² Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista –Jaboticabal, SP

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, CE

⁴Departamento de Ciências Biológicas e Agrárias– Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE

⁵Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia – Salvador, BA

⁶Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Ceará – ADAGRI, Sobral, CE

RESUMO

Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é diagnosticada rotineiramente pela técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), que é considerada pouco sensível. Objetivou-se com este estudo padronizar testes de Elisa-i e *Western Blot* (WB) para detecção de baixos níveis de anticorpos em caprinos contra CAEV e comparar os resultados obtidos nesses testes com a prova de IDGA. Para a padronização dos testes Elisa-i e WB utilizaram-se diferentes concentrações e diluições de antígeno, soros e conjugado. No Elisa-i adotou-se microplacas rígidas com 96 poços, sendo a combinação de concentração de 0,5µg/poço de antígeno e diluições de 1:100 de soro e 1:1500 de conjugado a que apresentou melhor resultado. No WB foi utilizado membranas de nitrocelulose, definindo-se as diluições de 1:50 de soro e 1:15000 de conjugado. Para avaliar o desempenho das técnicas, 222 amostras de soro caprino foram testadas e os dados obtidos foram comparados com o IDGA. A soropositividade do WB, Elisa-i e IDGA foram de 30,6%, 11,7% e 4,5%, concomitantemente. A concordância de Elisa-i/IDGA, WB/IDGA e WB/Elisa-i foi de 90,1%, 73,9% e 72,5%, respectivamente. As

técnicas de Elisa-i e WB apresentaram-se mais sensíveis que a IDGA, podendo ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico precoce da CAE.

Palavras-chave: infecção, LVPR, testes sorológicos.

ABSTRACT

Caprine arthritis-encephalitis (CAE) is routinely diagnosed by the technique of Agarose Gel Immunodiffusion (AGID), which is considered sensitive low. The objective of this study was to standardize testing i-ELISA and Western Blot for early detection of antibodies against CAEV in goats and compare the results obtained in these tests with proof of AGID. For standardization of i-ELISA and WB were used different concentrations and dilutions of antigen, sera and conjugate. In the i-ELISA, was adopted rigid microplate with 96 wells, the combination that showed the best result was concentration of 0.5µg/ well of antigen and dilutions of the serum of 1:100 and conjugate of 1:1500. In the WB was used nitrocellulose membranes, was defining the dilutions of the serum of 1:50 and conjugate of 1:15000. To evaluate the performance of the techniques, 222 goat serum samples were tested and the data were compared with the AGID. Seropositivity of the WB, i-ELISA and AGID were 30.6%, 11.7% and 4.5%, concomitantly. The agreement i-ELISA/AGID, WB/AGID and WB/i-ELISA was 90.1%, 73.9% and 72.5%, respectively. The techniques of i-ELISA and WB were more sensitive than the AGID and can be used as tools for early diagnosis of CAE.

Keywords: infection, serological tests, SRLV.

INTRODUÇÃO

Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) infecta caprinos de qualquer raça, sexo e idade, possui extenso período de incubação e se enquadra no grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), necessitando de vigilância epidemiológica constante devido à sua dispersão mundial (Franke, 1998).

Artrite-Encefalite Caprina (CAE) causada por esse vírus é considerada uma enfermidade multissistêmica crônica, incurável, com evolução clínica lenta e

progressiva. Os sinais clínicos são: artrite, com aumento do volume das articulações; pneumonia com dificuldade respiratória; encefalite com paresia e paralisia; mastite indurativa com nodulações no úbere (Greenwood, 1995).

A técnica laboratorial mais comumente utilizada para diagnóstico da CAE é a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), que não é muito sensível (McConnell et al., 1998) e baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo que se insolubilizam e precipitam no gel, sob uma base rígida, onde se desenvolve a linha de precipitação visível entre os orifícios no ponto em que é alcançada a relação ótima entre antígeno e anticorpo (Varea et al., 2001).

Seguido do Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i) que é usado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soroepidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (Madruga et al., 2001) e é considerado um teste bastante sensível que requer cuidados quanto à padronização da técnica.

Como padrão ouro na validação desses testes, tem-se o *Western Blot* (WB) ou *immunoblotting*, que é classificado como um teste complementar. Apresenta como vantagem menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos (Zanoni et al., 1989).

Devido aos prejuízos causados pela CAE (Greenwood, 1995; Brito, 2009; Carneiro, 2011) e considerando que a sorologia por IDGA apresenta desvantagens na detecção de anticorpos contra o vírus, favorecendo a permanência de animais soropositivos no rebanho, objetivou-se com este estudo padronizar testes de Elisa-i e *Western Blot* para diagnóstico precoce de anticorpos em caprinos contra CAEV e comparar os resultados obtidos nesses testes com a prova de IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de antígenos, foram utilizados cultivos secundários de membrana sinovial caprina (MSC). Garrafas roller (850 cm²) foram cultivadas com MSC até 70 a 80% de confluência e inoculadas com a amostra padrão CAEV-Cork, com titulação de 10^{-5,3} TCID₅₀/mL. As coletas do sobrenadante do cultivo celular foram submetidas a três ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 37°C para a lise celular e liberação

de partículas virais, conforme metodologia descrita por Pinheiro et al. (2006). Este estudo seguiu as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA) de acordo com o protocolo de N° 014.12.

O antígeno utilizado na técnica de IDGA foi preparado conforme metodologia de Pinheiro et al. (2010). O sobrenadante foi clarificado por centrifugação a 3.300 g (rotor IEC 216) a 4°C por 20 minutos. Submetido à técnica de ultrafiltração em sistema AMICON[®], em membrana de 10 KDa onde o material retido no sistema foi retirado e tratado com éter durante 10 minutos para destruição das glicoproteínas e liberação das proteínas internas do virion, em seguida foi armazenado a -20°C até a realização dos testes.

Para Elisa-i o material foi clarificado por centrifugação a 10.000 rpm durante 30 minutos. O pellet de células foi ressuspense em solução de PBS (proporção de 1:10 do volume inicial), e em seguida foi tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS), a uma concentração final de 0,1% (v/v). O tratamento foi realizado durante 10 minutos, em temperatura ambiente, sob homogeneização. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000g durante 15 minutos, a 4°C (Torres et al., 2009). A concentração da proteína total do antígeno foi determinada pelo método de Bradford (1976). Após esse procedimento o antígeno foi mantido a -20°C.

O antígeno utilizado na técnica de WB foi submetido à precipitação com polietilenoglicol - PEG-8000 a 40% até a concentração final de 8%, durante um período de 18h a 4°C, subseqüentemente foi centrifugado a 4°C a 12000 g por 60 minutos. O sedimento foi ressuspense em TNE (10,0mM tris-HCl, pH 7,4; 10,0mM NaCl; 1,0mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral, em seguida foi ultracentrifugado em colchão de sacarose (UCCS) (25% em TNE) conforme protocolo de Dantas et al. (2008), a 42000 g por 120 minutos. O sedimento foi ressuspense em PBS (0,05M; 0,15M NaCl; pH 7,4) contendo 2×10^{-4} M de *phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF) sendo a concentração proteica total determinada pelo método de Bradford (1976), e o antígeno mantido a -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

Para a execução da microtécnica de IDGA seguiu protocolo de Gouveia et al. (2000). Foi preparado gel de agarose a 0,9% em tampão fosfato salino. Esse gel foi

distribuído em lâminas de vidro, perfurado com uma roseta padrão de seis poços equidistantes e preenchidos com uma quantidade de 30 μ L de soros testes, soro padrão e antígeno para cada poço correspondente. Para a visualização das linhas de precipitação a leitura foi realizada 48-72 horas, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a segunda leitura.

Para o teste Elisa-i utilizou microplacas rígidas com 96 poços (*Nunc immuno plate/ M9410 – 1CS*). O volume de soluções distribuído em todas as etapas foi de 100 μ L por poço. O antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e distribuído nos poços em diferentes concentrações: 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 μ g/mL, sendo cada linha da placa uma concentração. A placa ficou incubando por 60 minutos a 37°C, e posteriormente ficou *over night* sob refrigeração. Após esse processo de sensibilização a placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%, 0,05% de Tween 20).

Em seguida bloqueou-se os sítios livres com tampão PBS-caseína (caseína a 2%) por 1 hora e 30 minutos a 37°C e após esse período a placa foi lavada duas vezes. Na primeira coluna da placa foram distribuídos 100 μ L de tampão de incubação (TI - PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20), correspondendo assim à coluna do branco. Os soros controle positivo, negativo e reagente do *kit* de IDGA (Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA), foram diluídos em TI, nas proporções de 1:50 e 1:100. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 60 minutos.

Os soros foram descartados e a placa foi lavada seis vezes. Distribuiu-se o conjugado DONKEY (Anti-Sheep IgG Peroxidase - SIGMA) nas diluições de 1:1000 e 1:1500 em TI. A placa foi incubada a 37°C por 60 minutos. Repetiu-se o processo de descarte e seis lavagens. Para a revelação utilizou-se o substrato tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 5,0) com adição de 0,02% de H₂O₂ e 0,2 mg/mL de σ -phenylenediamine (OPD), por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A reação foi bloqueada pela adição de 20 μ L de 0,4 M H₂SO₄. A intensidade da cor da reação foi determinada por absorbância em leitor de microplacas de Elisa-i com comprimento de onda de 492nm.

A diluição ótima do soro foi determinada pela diferença entre as densidades ópticas obtidas nas leituras dos soros positivos e negativos, aquela que apresentou maior diferença nas diferentes concentrações de antígeno foi escolhida (Pinheiro, 2001). A

partir daí, foi determinado o ponto de corte (*cut off*) do Elisa-i, com a utilização de duas placas, sendo 41 soros diferentes de caprinos adultos sabidamente soronegativos para cada placa, totalizando 82 amostras.

A técnica de *Western Blot* foi padronizada a partir de modificações no protocolo de Aragão et al. (2008). Para determinação das bandas proteicas do vírus foi preparado um gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 4% de concentração e 12,5% de separação. Nos locais de aplicação das amostras foram utilizadas concentrações de 6µg, 12µg e 18µg de antígeno, acompanhado com padrão de peso molecular LMW Electrophoresis (Pharmacia Biotech®), com bandas de 20; 30; 43; 67 e 94 KDa.

Para a migração eletroforética utilizou aparelho da BIO-RAD modelo Power Pac™ HC, ajustado para a programação inicial de 300 Watts (W), 1,00 Ampères (A) e 170 volts (V). As proteínas do gel foram coradas com azul de Comassie, escaneadas e analisadas através do software Bio Doc-IT-LS® 6.0 do VisiDoc-IT, gel documentation System da UVP.

Para padronização das diluições do soro, conjugado e tempo de revelação no WB foi preparado um gel utilizando a menor concentração de antígeno, ou seja, 6µg/µL por poço, porém para facilitar a técnica, foi confeccionado um pente com duas canaletas, uma com a largura convencional utilizada para o padrão de proteína e outro 10 vezes mais larga que a padrão, sendo utilizada uma quantidade de 13 µL de antígeno.

As bandas proteicas inicialmente separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma Membrana de Nitrocelulose (MN) (PROTAN BA 85 is stuck 150 X 200 mm de 0,45 µm), com auxílio de equipamento da BIO-RAD modelo Power Pac™ HC, programado inicialmente para 300 W, 1,00 A e 100 V, por 60 minutos.

Após a transferência a MN foi colocada em recipiente contendo corante Ponceau's (cat. 6226-79-5 - SIGMA), sob agitação, até que fossem visualizadas as bandas de proteínas, após isto o corante foi retirado e a membrana lavada com água destilada até que as bandas fossem observadas com mais nitidez. A faixa de membrana correspondente ao padrão de peso molecular foi retirada e guardada até a revelação.

As proteínas foram bloqueadas em solução de bloqueio PBS Tween 0,3% por 60 minutos e lavadas com solução de PBS-Tween 0,05% por três vezes cinco minutos cada lavagem. A membrana foi recortada em tiras, que foram enumeradas e colocadas em

tubos de ensaio de 5mL. Foi utilizado o soro controle positivo e negativo para CAEV do kit comercial usado no IDGA (Veterinary Diagnostic, ICA - USA) e cinco amostras. O conjugado foi o anti-IgG caprino marcado com peroxidase (SIGMA®).

Os soros e o conjugado foram diluídos em solução PBS 1X. Foram testados dois protocolos, no primeiro foi adotado para o soro a diluição de 1:50 por 30 minutos e do conjugado de 1:15000 por 60 minutos, e no segundo de 1:100 para o soro por 30 minutos e conjugado 1:18000 por 30 minutos. Após o tempo de reação dos soros testes, as tiras foram submetidas a três lavagens com PBS-Tween 0,05% de cinco minutos cada. Em seguida foi adicionado o conjugado. Após o tempo de incubação do conjugado de 60 ou 30 minutos, para os protocolos I e II, respectivamente, as tiras da membrana foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05% e uma vez com PBS 1X, cinco minutos cada, em seguida, foram retiradas dos tubos de ensaio e colocadas em um recipiente.

Para a revelação foi utilizado os substratos, 4-Cloro-1-Naphthol e 3,3' Diaminobenzidine (DAB), acrescido de peróxido de hidrogênio a 30%. As bandas de proteína ficaram ao abrigo da luz e a reação foi interrompida com adição de água destilada. Na leitura foi considerado positiva a amostra que apresentou polipeptídeo com peso molecular próximo a 28 KDa, considerando os parâmetros de referência, padrão de peso molecular e controle positivo (Oliveira et al., 2008).

As técnicas de IDGA, Elisa-i e WB foram aplicadas utilizando 222 amostras de soro caprino provenientes de um rebanho leiteiro pertencente a Embrapa Caprinos e Ovinos, localizado no município de Sobral numa região semiárida do sertão Cearense.

Os dados foram tabulados no programa Excel® e analisados estatisticamente nos programas *Win Episcopy* 2.0 e EPI Info™ 7.0, obtendo-se os resultados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, concordância dos testes, índice Kappa e Qui-Quadrado (χ^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O antígeno produzido para o Elisa-i apresentou uma concentração proteica de 0,82 µg/µL. A padronização do teste Elisa-i foi realizada variando a concentração de proteína de antígeno por poço, de soro e conjugado. A melhor diluição obtida de soro e

conjugado foram de 1:100 e 1:1500, respectivamente, na concentração de antígeno de 0,5µg/poço. O ponto de corte foi obtido através das médias dos 82 soros negativos mais três vezes o desvio padrão, resultando no valor de 0,398.

A concentração proteica do antígeno produzido para o WB obtida no Bradford foi de 4,25 µg/µL. Em eletroforese, as bandas de proteínas encontradas no gel em KDa foram: 14; 22; 26; 28; 33; 36; 39; 45; 55; 67; 79; 86; 95; 103; 115; 127; 135 e 142. Com a realização da transferência e WB somente algumas bandas proteicas foram evidenciadas, dentre elas as de 28 KDa; 45 KDa e a de 67KDa.

As melhores diluições do WB de soro e conjugado foram 1:50 e 1:15000, respectivamente. A escolha desta foi por exibir melhor reação equivalente a proteína de peso molecular 28 KDa (Fig. 1), que é a mais imunogênica.

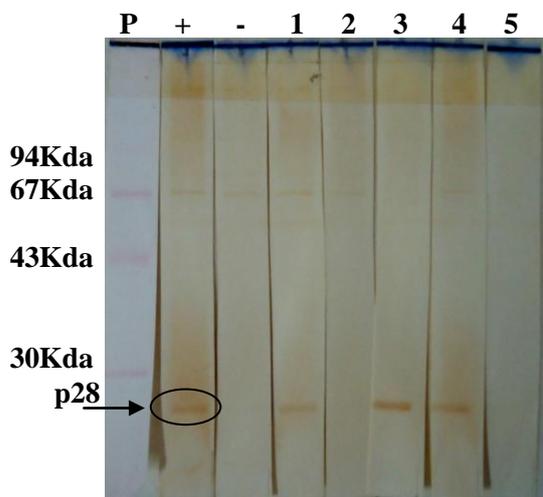


Figura 1. Padronização do Western Blot para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina. Diluição do soro 1:50 e do conjugado 1:15000. Padrão de peso molecular (P), controle positivo (+), controle negativo (-) e soros testes (1 a 5).

Assim, a banda proteica para o vírus da CAE mais visível foi da proteína do capsídeo viral cujo peso molecular varia de 28 a 29 KDa e representa o maior componente estrutural do núcleo (Hirsh e Zee, 2003), sendo a proteína de base para a interpretação dos testes sorológicos.

Na metodologia de produção de antígenos no diagnóstico da CAE, a escolha da estirpe viral e os componentes do vírus são fatores que podem influenciar nos resultados quanto à sensibilidade e a veracidade dos testes sorológicos (Celler Jr. et al., 1998). Desta forma, a escolha de um antígeno influencia marcadamente os resultados.

Na prova de IDGA a utilização de um antígeno com as duas proteínas (gp 135 e p 28) aumentam a sensibilidade (Pinheiro et al., 2006). No entanto, o antígeno

empregado neste trabalho para a técnica de IDGA, evidenciou apenas a p 28. Estudos apontam que o emprego de testes com a glicoproteína de superfície (gp 135) do vírus do CAEV mostrou-se mais sensível do que utilizando os da nucleoproteína (p 28) (Pinheiro et al., 2010). No WB, a gp 135 não foi transferida para MN. Na padronização do teste Elisa-i foi observada que o soro reagente do *Kit* comercial, abundante em anticorpos contra a gp 135, demonstrou boa reação. O soro positivo rico em gp 135 e p 28 foi altamente positivo. Baseado nisso, considerou que o antígeno produzido para o teste de Elisa-i possuía quantidades suficientes das duas proteínas para serem detectadas.

O SDS utilizado no tratamento do antígeno viral do teste Elisa-i é um detergente iônico que, em baixas concentrações, ajuda a expor epítomos ou determinadas proteínas antigênicas para melhorar o reconhecimento entre antígeno-anticorpo, o que, por consequência, aumenta a sensibilidade na detecção de anticorpos. Esse tratamento aparentemente não alterou o perfil protéico viral de CAEV, mantendo-se similar ao perfil-padrão, contribuindo para aumentar a sensibilidade na relação entre antígeno viral e antígeno celular (Torres et al., 2009).

Há grande dificuldade em se determinar o verdadeiro status sanitário do animal, pois a CAE se trata de uma doença com progressão lenta e soroconversão muitas vezes tardia (Castro et al., 1999). O IDGA e Elisa-i são os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal para o diagnóstico sorológico de infecção por LVPR (OIE 2010). A técnica de IDGA é amplamente utilizada para o diagnóstico do CAEV, porém possui desvantagem devido à possibilidade de permanência de animais infectados no rebanho, detectando somente animais com altos níveis de anticorpos (Melo e Franke 1997; Pinheiro et al., 2001; Moura Sobrinho et al., 2010).

O teste de Elisa-i detectou 11,7% (26/222) de animais soropositivos enquanto que apenas 4,5% (10/222) foram reagentes no IDGA (Tab.1).

Tabela 1. Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de Elisa-i e IDGA para detecção de anticorpos contra CAEV.

	IDGA		Total
	Positivo	Negativo	
Elisa-i	Positivo	19	26
	Negativo	193	196
Total		212	222

Sensibilidade: 70%; Especificidade: 91%; Valor preditivo positivo: 26,9%; Valor preditivo negativo: 98,5%; Concordância: 90,1%; Índice *kappa*= 0,35; Qui-quadrado: 28,76.

O Elisa-i apresentou resultado superior ao teste de IDGA, sendo um teste mais recomendado para detecção precoce. Torres et al. (2009) observaram que a sensibilidade e especificidade do Elisa-i quando comparado ao IDGA foi de 73,3% e 84%, respectivamente. Em estudo semelhante à concordância desses testes foi de 97,43% (Cruz et al., 2009).

Das amostras testadas por WB observou-se que 30,6% (68/222) foram soropositivas. Os valores estimados de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), concordância, índice Kappa e Qui-quadrado (χ^2) quanto a comparação dos resultados obtidos para os testes de WB e IDGA estão demonstrados na Tab.2.

Tabela 2. Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de WB e IDGA para detecção de anticorpos contra CAEV.

Western Blot	IDGA		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	10	58	68
Negativo	0	154	154
Total	10	212	222

Sensibilidade: 100%; Especificidade: 72,6%; Valor preditivo positivo: 14,7%; Valor preditivo negativo: 100%; Concordância: 73,9%; Índice kappa= 0,2; Qui-quadrado: 20,42.

Todas as amostras reagentes no IDGA concordaram com os resultados do WB, mas três não foram consideradas soropositivas para o ponto de corte estabelecido no Elisa-i. Quando o WB e Elisa-i foram comparados, foi observada uma concordância entre os testes de 72,5% (Tab. 3).

Tabela 3. Comparação dos resultados dos soros caprinos entre as técnicas de WB e Elisa-i para detecção de anticorpos contra CAEV.

Western Blot	Elisa-i		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	22	46	68
Negativo	4	150	154
Total	26	196	222

Sensibilidade: 84,6%; Especificidade: 76,5%; Valor preditivo positivo: 32,4%; Valor preditivo negativo: 97,4%; Concordância: 72,5%; Índice kappa= 0,36; Qui-quadrado: 37,56.

O WB conseguiu ser mais eficaz na detecção precoce quando comparada com os outros métodos aplicados neste estudo, mostrando uma sensibilidade de 100% e especificidade 72,5% quando comparado ao IDGA, e de 84,6% e 76,5%

respectivamente em relação ao Elisa-i. Os dados mostraram significativos para o qui-quadrado ($p < 0,001$). A classificação do índice Kappa das análises com Elisa-i/IDGA e WB/Elisa-i foram expressas como consideráveis segundo Thrusfield (1995), já o WB mostrou pobre concordância com a IDGA. A pouca semelhança do WB quando comparado a outras técnicas, se deve ao fato de ser um teste bastante eficaz, que detecta um número maior de animais infectados, sendo considerado o *gold test* na validação de outras técnicas (Zanoni et al., 1989).

CONCLUSÕES

Os testes de Elisa-i e WB são mais sensíveis quando comparados ao teste de IDGA. O WB por sua vez é mais sensível que o Elisa-i na detecção de anticorpos anti-CAEV. Portanto, essas técnicas podem ser utilizadas como ferramentas para a detecção de baixos níveis de anticorpos em animais infectados com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos e Ovinos, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico - FUNCAP e ao Banco do Nordeste.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, M.A.C.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A. et al. Maedi-Visna Vírus: produção de antígeno, análise proteica e antigênica. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, p.423-429, 2008.

BRADFORD, M.M.A. *Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.*, v.72, p.248-54, 1976.

BRITO, R.L.L. *Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras*. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

CARNEIRO, F.F.D. *Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina*. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

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

CELER Jr. V.; CELER, V.; NÉMCOVÁ, H.; ZANONI, R.G. et al. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and IDGA test. *Zentralbl. Veterinarmed B.*, v.45, p.183-188, 1998.

CRUZ, R.B.; PUTINI, V.B.; SANTANA, G.S. et al. Estudo comparativo da sensibilidade e da especificidade de ELISA indireto com o teste de imunodifusão em gel de agarose no diagnóstico sorológico da artrite-encefalite caprina (CAE). *R. Acad. Ciênc. Agr. Amb.*, v.7, p.355-364, 2009.

DANTAS, T.V.M.; ARAÚJO, S.A.C.; PINHEIRO, R.R. et al. Desenvolvimento e padronização de um ELISA indireto para diagnóstico de maedi visna em ovinos. *Ci. Anim. Bras.*, v.9, p. 181-187, 2008.

FRANKE, C.R. *Controle Sanitário da Artrite-Encefalite Caprina*. Salvador: EDUFBA, 1998. 70p.

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 MEDICINA VETERINÁRIA, 27., 2000., Águas de Lindóia. *Anais...* Águas de Lindóia: [s.n.] 2000. p.33.

GREENWOOD, P.L. Effects of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, n.22, p.71-87, 1995.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.411-424.

KONISHI, M.; NAGURA, Y.; TAKEI, N. et al. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small Rum. Res.*, v.99, p.65-71, 2011.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte*, 2001, p.145-175.

McCONNELL, I.; PETERHANS, E.; ZANONI, R.G. Concordance with reference sera of a recombinant protein ELISA for maedi-visna antibody detection. *Vet. Rec.*, v.142, p.431-433, 1998.

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

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal, 2010. Disponível em <<http://www.oie.int>>. Acessado em: 5 de jul. 2012.

MOURA SOBRINHO, P.A.; RAMOS, T.R.R.; FERNANDES, C.H.C. et al. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. *Ci. Anim. Bras.*, v.11, p.117-124, 2010.

OLIVEIRA, M.M.M.; MELO, M.A.; ANDRADE, P.P. et al. Western Blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, p.263-270, 2008.

PINHEIRO, R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.133-137, 2010.

PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, v.101, p.51-56, 2006.

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. *Ciê. Rural.*, v.31, p.449-454, 2001.

THRUSFIELD, M.V. *Veterinary Peidemiology*. 2ed. Oxford: Blackwell Science, 1995. 479p.

TORRES, J.A.; CAMPOS, G.S.; FREITAS, M.M. et al. Produção de antígeno viral para o diagnóstico da artrite-encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA), *R. Ciênc. Méd. Biol.*, v.8, p.107-114, 2009.

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

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.

7 CAPÍTULO II

UTILIZAÇÃO DE TESTES SOROLÓGICOS COMO FERRAMENTAS EM PROGRAMA DE CONTROLE PARA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM REBANHO LEITEIRO

(Use of serological tests as tools in the control program to Caprine Arthritis
Encephalitis in dairy herd)

Periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (a ser submetido).

Utilização de testes sorológicos como ferramentas para controle da Artrite-Encefalite Caprina em rebanho leiteiro

[Use of serological tests as tools in the control program to Caprine Arthritis Encephalitis in dairy herd]

A.S. Rodrigues¹, R.R. Pinheiro², R.L.L. Brito³, L.S. Oliveira², E.L. Oliveira², V.W.S. Santos⁴, T.S. Souza⁵, J.C.M. Cruz², F.F.D. Carneiro⁶, A. Andrioli², M.F.S. Teixeira^{1*}

¹Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza, CE

* Endereço: Av. Paranjana, 1700, Fortaleza-CE, Cep: 60740-903, e-mail: labovirfavetuece@uece.br

²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, CE

³Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal, SP

⁴Departamento de Ciências Biológicas e Agrárias – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE

⁵Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia – Salvador, BA

⁶Departamento de Zootecnia– Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE

RESUMO

As estratégias de manejo e as práticas de diagnóstico são os métodos mais recomendados para o controle da Artrite-Encefalite Caprina (CAE). Objetivou-se com este estudo aplicar periodicamente, num rebanho leiteiro, testes de diagnóstico mais sensíveis aliados às medidas de manejo visando um controle eficaz para CAE, como também avaliar a transmissão transplacentária (vertical). Foram realizadas sete coletas de sangue a cada quatro meses em matrizes e reprodutores, utilizando os testes de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i) e *Western Blot* (WB). As crias que tiveram parto assistido foram avaliadas por IDGA e WB, logo após o nascimento. A prevalência dos animais adultos foi de 6,8%, 14,9% e 39,2% no IDGA, Elisa-i e WB, respectivamente. Na última análise foi detectado 1,9% no teste IDGA e 7,5% nos testes de Elisa-i e de WB. Um total de 283 neonatos foi avaliado ao nascimento e quatro foram soropositivos no WB. Apesar de não contemplar a erradicação da CAE, as medidas adotadas aliadas a utilização periódica dos testes sorológicos foram importantes para uma redução significativa de animais soropositivos no rebanho. Além disso, apesar de baixa frequência (1,4%) a via transplacentária de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) ocorre.

Palavras-chave: ELISA, IDGA, Lentivírus de pequenos ruminantes, *Western Blot*.

ABSTRACT

Management strategies and practices diagnostic are the methods recommended for control of Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE). The aim of this study was apply periodically, in a dairy herd, diagnostic tests more sensitive allies the measures management, aimed at effective control for Caprine Arthritis Encephalitis (CAE), as well as assess the transmission transplacental (vertical). Seven surveys serological were realized, every four months, with collected samples blood the bucks and matrices, using the agarose gel immunodiffusion (AGID) tests, Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and Western Blot (WB). The kids who had delivery assisted were evaluated by AGID e WB, shortly after birth. The prevalence of adult animals was 6.8%, 14.9% and 39.2%, respectively, for AGID, ELISA and WB. In the final analysis detected 1.9% in test AGID and 7.5% in tests ELISA and WB. A total of 283 neonates were assessed at birth and four were seropositive in the WB. Despite not contemplate eradicating CAE, the measures adopted allies to periodic serological tests were important to a significant reduction of the disease in the herd. Furthermore, although low frequency (1.4%) the transplacental via of Small Ruminant Lentivirus (SRLV) occurs.

Keywords: AGID, ELISA, small ruminant lentivirus, *Western Blot*.

INTRODUÇÃO

Caprinos de qualquer raça, sexo e faixa etária podem ser infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), que possui longo período de incubação, podendo variar de meses a anos (Dawson, 1989). A presença de lesões nas articulações, pulmão, sistema nervoso e glândula mamária são indicativos de infecção, todavia, em muitos casos, esta doença pode ser assintomática e os animais portadores do vírus se tornarem fonte de infecção (Gregory et al., 2011).

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) pode promover a queda da produção láctea, bem como redução dos níveis de gordura e de proteína do leite de cabras infectadas (Greenwood, 1995; Turin et al., 2005; Lilenbaum et al., 2007; Brito, 2009). Segundo

Carneiro (2011), esta enfermidade predispõe, ainda, os animais à verminose gastrointestinal por *Haemonchus spp.* elevando o número de vermifugações necessárias para o controle em até 70%, principalmente em matrizes primíparas, com consequente aumento dos custos, reduzindo a rentabilidade da atividade para o caprinocultor.

A infecção de crias por meio do colostro e leite de animais infectados torna a via digestiva a principal fonte de transmissão natural do CAEV (Lamara et al., 2001). Além desta, outras formas de transmissão a partir de secreções salivares, respiratórias, intrauterina e sexual, têm sido estudadas (Peterhans et al., 2004; Souza et al., 2012a).

Por não haver tratamento nem vacinas eficazes contra o vírus, a eficiência dos programas sanitários de controle da CAE depende de vários fatores, dentre eles: boas técnicas de manejo, principalmente sanitário, que visem à prevenção da transmissão pelo colostro e leite; boa sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial, além da frequência de sua utilização, no monitoramento sorológico e segregação dos soropositivos (Knowles, 1997; Leitner et al., 2010; Pinheiro et al., 2010).

Dentre as técnicas sorológicas existentes para o diagnóstico da CAE, a mais rotineiramente utilizada é a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), sendo de fácil aplicação e alta especificidade, indicada como teste de triagem (Varea et al., 2001), no entanto, possibilita a permanência de caprinos infectados no rebanho por detectar somente altos níveis de anticorpos. Essa técnica para ser aplicada em programas de controle não possibilita ao produtor confiabilidade nos resultados dos verdadeiros negativos. Para esse propósito é necessário que sua utilização seja empregada juntamente com outros testes mais sensíveis (Konishi et al., 2011), como o Ensaio Imunoenzimático Indireto (Elisa-i) ou o *Western Blot* (WB).

O teste Elisa-i é considerado mais sensível que IDGA, porém a especificidade é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa. Como teste complementar tem-se o WB, que apresenta alta sensibilidade e especificidade (Zanoni et al., 1989).

Com a aplicação de testes diagnósticos mais sensíveis, é possível detectar mais precocemente os soropositivos (Pinheiro et al., 2010), sendo essa uma ferramenta importante na implantação de programas de controle. Diante disso, este estudo teve como objetivos aplicar periodicamente, num rebanho leiteiro, testes de diagnóstico mais

sensíveis aliados as medidas de manejo visando um controle eficaz para CAE, como também avaliar a transmissão transplacentária (vertical).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a condução do estudo, grupos experimentais foram constituídos levando-se em consideração o princípio dos “3R’s”, que inclui a redução do número de animais em pesquisa científica (Resolução CFMV N. 879, de 15 de fevereiro de 2008), estando de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008). Este estudo recebeu a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA), sob o número 014/12.

O experimento foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, numa região semiárida do sertão Cearense, a 3° 42' de latitude Sul e 40° 21' de longitude Oeste e 83 metros de altitude. O rebanho leiteiro utilizado era constituído de matrizes, reprodutores e crias das raças Anglo-Nubiana e Saanen, sendo que os adultos tinham idade entre um e seis anos e as crias, recém-nascidas. O sistema de criação adotado foi o semi-intensivo.

Diversas medidas de manejo foram implantadas. As cabras eram divididas em grupos de forma que ocorressem três parições por ano, para que não houvesse intermitência na produção de leite. A cobertura adotada era monta natural controlada, sendo que cabras soronegativas eram cobertas com reprodutores soronegativos e cabras soropositivas com reprodutores soropositivos. O diagnóstico de gestação era realizado aos 45 dias com auxílio do ultrassom. A limpeza da instalação era feita diariamente, e a cada 15 dias aplicava-se vassoura de fogo. A ordenha realizada era de forma mecânica ou manual uma vez ao dia, ordenhavam-se primeiro as fêmeas do grupo soronegativo, seguindo linha de ordenha. Após a ordenha todos os equipamentos eram higienizados. Empregou-se, também, controle de fômites, como desinfecção de tatuadores e utilização de agulhas descartáveis. A fim de evitar infecções pelo colostro e leite contaminados as crias eram separadas de suas mães imediatamente após o nascimento e transferidas para outra instalação, onde recebiam colostro termizado (56°C, por uma hora) e,

posteriormente, leite pasteurizado. Todo animal a ser introduzido no rebanho passava por quarentena, sendo submetido a dois testes de IDGA e WB num intervalo de 60 dias.

De 1994 ao ano de 2008, o rebanho foi submetido ao programa de controle da CAE, com diagnóstico da enfermidade sendo realizado pela prova de IDGA com kit comercial Americano (*Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody test Kit Veterinary Diagnostic Technology, Inc*[®], USA). Posteriormente, este kit foi substituído pelo desenvolvido pela Embrapa Caprinos e Ovinos, seguindo-se protocolo empregado por Pinheiro et al. (2006). Essa técnica sorológica era realizada a cada seis meses e de acordo com os resultados os animais soropositivos eram separados do grupo dos soronegativos, sendo substituídos conforme os critérios de descarte adotado para sistema de criação de caprinos (Embrapa, 1996).

Neste estudo, além do IDGA utilizado no diagnóstico da CAE, as matrizes e reprodutores foram submetidos também aos exames de Elisa-i e WB. Foram coletadas amostras de sangue de cada animal através de punção da veia jugular, em tubo tipo vacutainer[®] de 10mL, sem anticoagulante, de intervalos de quatro meses, sendo realizado, ao todo, sete coletas.

As crias que tiveram parto assistido participaram deste estudo. Antes de mamarem o colostro termizado, os cabritos foram submetidos a coletas de amostra de sangue. Um total de 283 amostras de soro de neonatos foi analisado por IDGA e WB.

As amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica da Embrapa Caprinos e Ovinos, onde foram centrifugadas a 1500 x g por 15 minutos, armazenadas em tubo tipo eppendorf[®] e congeladas a -20°C até a realização das provas sorológicas. Para a realização do teste de IDGA, Elisa-i e WB foi utilizado antígeno derivado de cultivos secundários de células de membrana sinovial caprina, infectadas pela estirpe padrão CAEV-Cork, preparado a partir da metodologia de Pinheiro et al. (2006).

A microtécnica de IDGA seguiu protocolo de Gouveia et al. (2000). Foi preparado gel de agarose a 0,9% em tampão fosfato salino. Esse gel foi distribuído em lâminas de vidro, perfurado com uma roseta padrão de seis poços equidistantes e preenchidos com uma quantidade de 30µL de soros testes, soro padrão e antígeno para cada poço correspondente. Para a visualização das linhas de precipitação a leitura foi realizada 48-

72 horas, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a segunda leitura.

A técnica Elisa-i foi realizada em microplacas rígidas com 96 poços (Nunc® immuno plate/ M9410). A sensibilização das placas foi com 0,5µg/poço de antígeno em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6). O bloqueio com 100µL/poço de PBS-caseína a 2%. A diluição dos soros foi de 1:100 e de conjugado Donkey Anti-Sheep IgG peroxidase (Sigma cat. A3415) de 1:1500. Para a diluição desses foi utilizado tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20). Em todas as etapas do Elisa-i, as placas foram incubadas a 37°C e no intervalo de cada etapa, as placas eram submetidas a lavagens com solução salina 0,9% e Tween 20 a 0,05%. Para revelação, utilizou-se como substrato o σ -phenylenediamine (OPD) e H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH 5,0). Após 15 minutos ao abrigo da luz, foi realizada a parada da reação acrescentando-se 20µL de H₂SO₄ diluído em 1:20. A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas de Elisa-i com comprimento de onda de 492nm.

O teste de WB seguiu o protocolo de Aragão et al. (2008) com modificações. Foi realizada eletroforese SDS-PAGE com géis de concentração e separação a 4% e 12,5%, respectivamente. A seguir foi realizada a transferência das proteínas contidas no gel para membrana de nitrocelulose, que foram bloqueadas com PBS Tween a 0,3%. A técnica foi realizada com diluições de soro de 1:50 e conjugado Rabbit anti- Goat IgG peroxidase (Sigma cat. A5420) de 1:15000. A revelação das bandas de proteína ocorreu ao abrigo da luz, com os substratos 4-Cloro-1-Naphthol e 3,3' Diaminobenzidine (DAB), com H₂O₂ a 30% e parada com adição de água destilada.

Todos os dados foram tabulados no programa Excel® e analisados estatisticamente no programa EPI Info™ 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na soroprevalência dos animais adultos, observou-se que de 148 animais, 10 (6,8%) apresentaram anticorpos anti-CAEV no IDGA, 22 (14,9%) no Elisa-i e 58 (39,2%) no WB. Como o WB foi o teste que apresentou maior percentual de soropositividade no primeiro levantamento, além de ser considerado o padrão ouro na validação de testes sorológicos (Zanoni et al., 1989), foi adotado o resultado dele como

base para a separação dos animais em grupos soropositivo e soronegativo, sendo mantido esse critério por todos os demais levantamentos.

Com relação ao tipo racial das 136 matrizes, nove apresentaram anticorpos anti-CAEV no IDGA, 21 no Elisa-i e 54 no WB. Verificou-se, também, que 39,7% das fêmeas foram soropositivas enquanto que, nos reprodutores, este índice foi de 33,3% (4/12) ($p>0,05$). Analisando-se pelo teste WB, 64,8% (35/54) eram da raça Anglo-Nubiana e 35,2% (19/54) da raça Saanen ($p<0,05$). Apesar de esta enfermidade afetar animais de todos os tipos raciais é bastante documentada nas raças leiteiras (Contreras et al., 1998; Torres-Acosta et al., 2003; Moura Sobrinho et al., 2010).

Avaliando o resultado das três técnicas em conjunto (IDGA, Elisa-i e WB), no levantamento inicial, verificou-se que sete (4,7%) dos animais apresentaram reação soropositiva, sendo seis fêmeas e somente um reprodutor. A Fig. 1 apresenta o percentual de animais positivos detectados durante o programa de controle por meio das três técnicas realizadas.

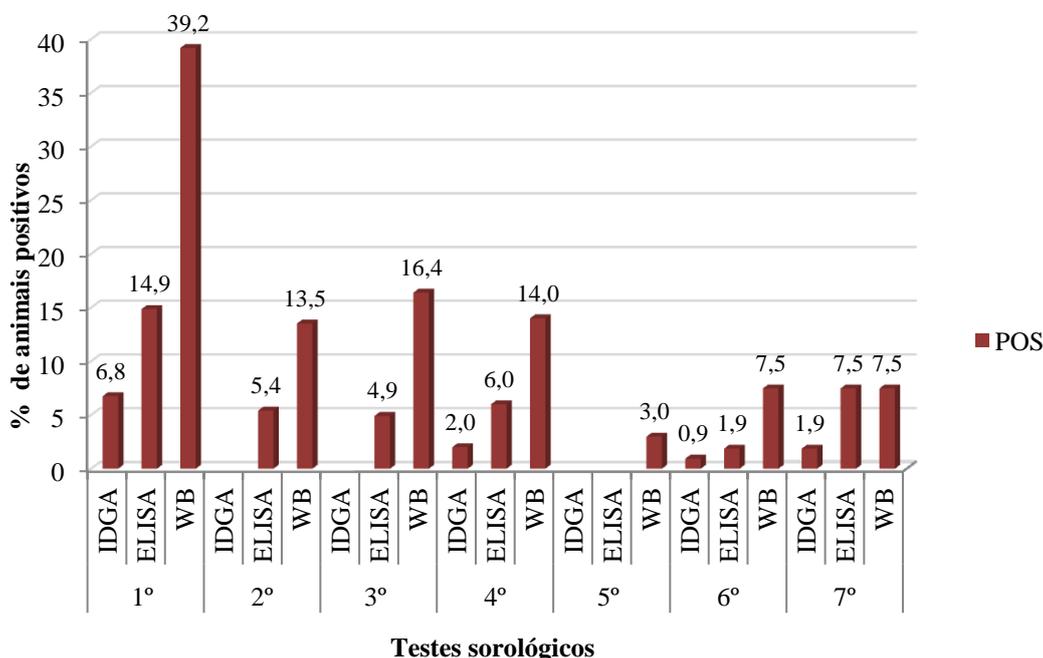


Figura 1. Percentual de animais soropositivos detectados pelo IDGA, Elisa-i e *Western Blot* em sete levantamentos, com intervalo de quatro meses, em rebanho leiteiro semi-intensivo.

Devido ao monitoramento periódico anterior adotado nesse rebanho pela técnica de IDGA, os resultados achados nesta primeira análise foram inferiores ao que geralmente são encontrados em rebanhos leiteiros infectados que não são submetidos a

algum tipo de controle. Melo e Franke (1997) analisando rebanhos leiteiros pela técnica de IDGA verificaram uma soroprevalência de 40,7% em animais caprinos com manejo intensivo provenientes da microrregião de Fortaleza, Ceará. Esse resultado coincide com os encontrados por Madureira e Gomes (2007), utilizando o IDGA, em propriedades leiteiras no interior de São Paulo, que obtiveram uma prevalência de 34,93%.

Desde a prevalência até a quinta coleta notou-se que houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na incidência, principalmente quando se levou em consideração os resultados do IDGA, o qual apresentou dois levantamentos seguidos (2^a e 3^a) sem animais soropositivos. Apesar de existirem animais positivos nos dois últimos levantamentos (6^o e 7^o) existe uma tendência a redução do número de animais soropositivos.

Na sexta coleta (Fig. 1) pode-se observar um crescimento no percentual de soropositivos, isso provavelmente ocorreu pela a entrada de animais jovens no rebanho, apesar desses terem sido submetidos às técnicas de IDGA e WB. Pode ter ocorrido soroconversão tardia desses jovens bem como nos animais que já estavam no rebanho e não tiveram anticorpos suficientes para serem detectados nos testes durante as coletas anteriores. Segundo Clavijo e Thorsen (1995) e Hanson et al. (1996), os baixos níveis de anticorpos, soro conversão tardia e reações soropositivas intermitentes são o grande problema para o controle desta virose.

A presença de animais falso-negativo no rebanho é um dos grandes entraves para os programas de controle (Castro et al., 2002). Isto fortalece a necessidade da utilização de testes diretos, como, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aliados aos testes sorológicos (Konishi et al., 2011).

Avaliando os resultados dos sete levantamentos, notou-se que apenas duas cabras não apresentaram positividade no WB, mas foram reagentes no Elisa-i. Por outro lado todos os soropositivos no IDGA também o foram no WB, porém três destes não reagiram no Elisa-i. Em alguns momentos houve uma pequena discordância entre o WB e o Elisa-i. Somente na última análise é que houve similaridade entre esses testes sendo detectados 7,5% de animais sororeagentes no Elisa-i e WB e 1,9% no IDGA (Fig. 1).

Nesse estudo o baixo percentual de positividade dado pelo IDGA pode, em parte, ser explicado pelo tipo de antígeno (Ag) utilizado – Ag produzido na Embrapa Caprinos

e Ovinos (Ag nacional) - que detecta principalmente anticorpos anti-proteína p28 do CAEV. Em pesquisa realizada no mesmo rebanho do presente estudo, comparando o Ag nacional e o do kit americano, que detecta anticorpos anti-gp135 e anti-p28, revelou a importância da escolha do Ag. Esta escolha influencia marcadamente os resultados do IDGA, sendo que a utilização de Ag com duas proteínas favorece para o aumento da sensibilidade (Pinheiro et al., 2010). Adams e Gorham (1986), ao compararem dois antígenos da CAEV, verificaram que o produzido com a gp135 detectou um maior número de animais positivos que o produzido com a p28, entretanto, existiam animais que apresentavam somente anticorpos contra a p28.

Com o objetivo de observar como a expressão de anticorpos varia durante o tempo em caprinos soropositivos, Hanson et al. (1996) utilizaram IDGA para detectar anticorpos em caprinos naturalmente infectados pelo CAEV para os antígenos gp135 e p28 do lentivírus Maedi-Visna (MVV). Observaram que os caprinos testados expressavam anticorpos tanto para gp135 como para p28. Entretanto, ocorreu maior frequência de anticorpos para gp135 em animais velhos que reagiam 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.

A escolha de provas laboratoriais mais sensíveis para a implantação de programa de controle é de suma importância para detecção precoce de animais positivos. Programas de controle já foram implantados em vários países e fornecem informações importantes sobre o controle da enfermidade, porém ainda é difícil sua erradicação, visto que os testes tem alto custo e o mais utilizado é o IDGA, que não detecta precocemente os soropositivos (Sihvonen et al., 2000; Konishi et al., 2011).

Apesar de dispor, neste estudo, de técnicos qualificados e de testes bastante sensíveis, os resultados revelam que as medidas de manejo adotadas, mesmo rigorosas, aliada a frequência dos testes, não foram suficientes para erradicar a enfermidade do plantel, apenas controlá-la. Em todas as coletas o WB detectou animais com anticorpos para o CAEV, sendo necessário, portanto, um tempo maior que sete avaliações quadrimestrais para eliminá-la.

A heterogeneidade e o potencial da transmissão interespecie dos lentivírus devem ser ponderados para o desenvolvimento de programas de sanidade de pequenos ruminantes (Souza et al., 2012b), para produtores que criam caprinos e ovinos juntos.

Com relação aos neonatos, dos 283 que participaram do estudo, 131 nasceram de progenitores soropositivos e 152 de soronegativos. O WB detectou soropositividade em quatro crias da raça Anglo Nubiana (1,4%), dessas, três (2,3%) eram de progenitores soropositivos e uma (0,7%) de soronegativo (Tab.1). Estes progenitores foram avaliados por três testes de WB, Elisa-i e IDGA intervalados de quatro meses.

Tabela 1. Testes de IDGA e WB em cabritos imediatamente após o nascimento.

CRIA ^a	Idade	IDGA	WB	Progenitores (WB)
1		-	+	+
2	Nascimento (0h)	-	+	+
3		-	+	+
4		-	+	-

^a As crias de números 2 e 3 nasceram dos mesmos progenitores.

A infecção muito provavelmente não ocorreu no canal do parto, pois a coleta de sangue do cabrito para realização dos testes aconteceu imediatamente após o nascimento. Desta forma, se as crias apresentaram anticorpos anti-CAEV é porque adquiriram, possivelmente, no ambiente uterino. Mesmo que as crias tenham ingerido líquido infectado no momento do parto, não ocorreria, em tempo hábil, produção de anticorpos para ser detectado nos testes, portanto é sugerido que tenha ocorrido transmissão transplacentária, mesmo que baixa. Ding e Xiang (1997) analisando o WB através das reações em scanner, verificaram que pode-se detectar anticorpos anti-P28 (proteína do gene *gag* - capsídeo do CAEV) a partir do 4 dias pós-infecção. Este tempo necessário para o aparecimento de anticorpos detectáveis reforça a transmissão transplacentária.

Estes achados corroboram com o observado por Konishi et al. (2011), o qual verificou que crias separadas imediatamente após o nascimento, foram positivas, aos dois meses de idade, no IDGA. Estes animais eram oriundos de um rebanho infectado e filhos de pais positivos (somente o pai, somente a mãe ou ambos). Brodie et al. (1994) sugerem que a transmissão intrauterina de lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) pode ocorrer em até 10% das crias nascidas de matrizes infectadas, e que um título viral alto na mãe pode ser um importante fator na transmissão uterina.

Cross et al. (1975) descreveram lesões típicas de pneumonia progressiva ovina em cordeiros nascidos por cesárea de ovelhas infectadas, enquanto Sihvonen (1980) e Cutlip et al. (1981) isolaram o vírus da Maedi-Visna em fetos de mães soropositivas.

Lara e colaboradores (2005), também, verificaram a possibilidade de infecções pelo CAEV através da via de transmissão transplacentária ou no momento do parto em 26 cabritos, avaliados por IDGA, que nasceram de cabras soropositivas. Nenhum cabrito foi considerado sororreagente aos antígenos do vírus, indicando que a possibilidade dessa via de transmissão vertical é menor que 3,8% ($1 < 26$). Comparando os trabalhos, este estudo utilizou-se um número maior de cabritos (283 crias) que foram avaliados por duas técnicas, IDGA e WB. Não foi relatado também nenhum neonato positivo pela prova de IDGA, todavia o WB apresentou 1,4% de crias soropositivas, o que infere que o IDGA não é indicado para detectar anticorpos anti-CAEV em cabritos recém-nascidos.

Alvarez et al. (2005) estudando, em cordeiros, a transmissão do vírus da Maedi-Visna pelo colostro de ovelhas infectados com o MVV verificou que um dos animais separado logo após o nascimento, antes de receber o colostro, apresentava-se soropositivo no teste de ELISA comercial. Estes autores (Alvarez et al., 2006) aplicando um teste de PCR nestes mesmos animais verificaram que 13 de 204 (6,4%) cordeiros nascidos de ovelhas soropositivas foram positivos ao nascimento. Observaram ainda que destes oito animais foram PCR positivos somente a zero hora e negativo nas outras coletas (15, 30, 90, 180 e 300 dias). Estes dados corroboram com os achados neste trabalho onde se verificou que (2,2%) dos animais positivos, pelo WB, antes de receberem o colostro, eram de progenitores soropositivos.

Outros trabalhos, também, questionam a possibilidade da transmissão intrauterina dos LVPR (Hanson et al., 1996; Blacklaws et al., 2004; Peterhans et al., 2004).

O tipo de placenta dos ruminantes é a sindesmocorial, esta apresenta cinco membranas entre a circulação materna e a fetal, impedindo a passagem de anticorpos entre as duas circulações (Lima et al., 2009), porém pode haver passagem do vírus em algum momento, visto que ele encontra-se no trato reprodutivo (Andrioli et al., 1999; Andrioli et al., 2002; Cavalcante, 2011).

Andrioli et al. (2002) constataram, por isolamento viral seguido de PCR Nested, que o CAEV estava presente no fluido uterino de cabras portadoras corroborando com

os achados de Fieni et al. (2003) que, também, verificaram a presença deste vírus em meios de lavagens de embriões.

Cavalcante (2011) observou, pelo RT-PCR, que seis cabras apresentavam partículas virais livres no fluído uterino demonstrando a possibilidade de transmissão pelo mesmo, o que explica a produção de anticorpos detectada pelo WB nos neonatos deste estudo.

A sorologia positiva da cria proveniente de progenitores soronegativos pode ser justificada pelo fato de que, provavelmente, a matriz estaria infectada, pois fatores como soroconversão tardia, latência viral, latência sorológica e replicação restrita podem ter restringido a presença de anticorpos em quantidade suficiente para ser detectado durante os levantamentos. No entanto, o vírus possivelmente estava no trato reprodutivo da fêmea e foi transmitido à cria. Cutlip e colaboradores (1981) isolaram MVV de um feto, retirado por cesárea, de uma ovelha soronegativa que havia estado em contato com ovelhas soropositivas. Cavalcante (2011) estudando 13 matrizes inoculadas pela cepa viral CAEV Cork e todas soropositivas no IDGA e WB com 30 e 60 dias pós-infecção, verificou que após 24 meses os animais soronegativaram no IDGA e somente três tiveram resultado positivo no WB. Observou, também, que dessas treze cabras, três tiveram resultado negativo no IDGA, Elisa-i, WB e PCR-Nested de sangue, porém foram positivas no PCR-Nested e/ou RT-PCR de ovócito e/ou fluído uterino, demonstrando reações soropositivas intermitentes e que o vírus em algum momento pode encontrar-se em órgãos e não na corrente sanguínea.

CONCLUSÕES

A adoção periódica de testes mais sensíveis é importante, sendo uma eficaz ferramenta em programas de controle, pois detectam mais precocemente animais soropositivos, dando o direcionamento das medidas que devem ser implantadas, porém é necessário um tempo maior de acompanhamento dos caprinos, visto que houve uma redução significativa da CAE no rebanho, porém não foi alcançada a erradicação da enfermidade.

É importante a associação de técnicas sorológicas sensíveis a técnicas moleculares em programas de controle avançado para a erradicação.

Apesar da baixa frequência, a transmissão vertical dos LVPR ocorre, e tem repercussão no programa de controle.

AGRADECIMENTOS

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos e Ovinos pela concessão das condições técnicas e estruturais, a CAPES pela bolsa de estudos concedida, e ao CNPq, FUNCAP e Banco do Nordeste pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

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

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

ALVAREZ, V.; DALTABUIT-TEST, M.; ARRANZ, J. et al. PCR detection of colostrum-associated maedi-visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res. Vet. Science.*, v.80, p.226-234. 2006.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesq. Agr. Bras.*, v.41, p.1313-1319, 2006.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MOURA-SOBRINHO, P.A. et al. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.24, p.215-220, 2002.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R. R. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Bras. Rep. Anim.*, v.23, p.420-421, 1999.

ARAGÃO, M.A.C.; PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A. et al. Maedi-Visna Vírus: produção de antígeno, análise proteica e antigênica. *Arq. Inst. Biol.*, v.75, p.423-429, 2008.

BLACKLAWS, B.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S. et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.* 101, 199-208, 2004.

- BRITO, R.L.L. *Implicações da Artrite-Encefalite Caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras*. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- BRODIE, S.J.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; KOENIG, G. et al. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. *J. Infect. Dis.*, v.169, p.653-657, 1994.
- CARNEIRO, F.F.D. *Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina*. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; AZEVEDO, E.O. et al. Soroconversão e sororeatividade de cabras leiteiras naturalmente expostas ao vírus da Artrite encefalite caprina no Brasil. *Cien. Rural.*, v.32, p.603-607, 2002.
- CAVALCANTE, F.R.A. *Detecção do vírus da Artrite-Encefalite Caprina por PCR-Nested e RT-PCR-Nested em ovócitos e fluido uterino de cabras infectadas*. 2011. 48f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- 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, p.841-848, 1995.
- CONTRERAS, A.; CORRALES, J.C.; SANCHEZ, A. et al. Caprine arthritis-encephalitis in an indigenous Spanish breed of dairy goat. *The Vet. record.*, v.142, p.140-2, 1998.
- CROSS, R.F.; SMITH, C.K.; MOORHEAD, P.D. Vertical transmission of progressive pneumonia of sheep. *Am. J. Vet. Res.*, v.36, p.465-468, 1975.
- CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; JACKSON, T.A. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. *American Journal Veterinary Research*, v. 42 p. 1795-1797, 1981.
- DAWSON, M. The Caprine Arthritis-Encephalitis syndrome. *Vet. Annual*, v.29, p.98-102, 1989.
- DING, E.Y.; XIANG, W.H. Immune response in goats to caprine arthritis-encephalitis virus. *Viral Immunol.*, v.10, p.111-115, 1997.
- EMBRAPA. *Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV-II)*. Sobral: EMBRAPA. 1996, 110p.
- FIENI, F.; ROWE, J.; HOOSEAR, K. et al. Presence of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology*, v.59, p.1515-1523, 2003.

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 MEDICINA VETERINÁRIA, 27., 2000., Águas de Lindóia. *Anais...* Águas de Lindóia: [s.n.] 2000. p.33.

GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, v.22, p.71, 1995.

GREGORY, L.; LARA M.C.C.S.H.; HASEGAWA M.Y. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em pulmão, glândula mamária, cérebro e líquido sinovial de cabras naturalmente infectadas pela técnica de nested-PCR. *Med. Vet.*, v.5, p.7-11, 2011.

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

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.

KONISHI, M.; NAGURA, Y.; TAKEI, N. et al. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small Rum. Res.*, v.99, p.65-71, 2011.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L. et al. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res.*, v.79, p.165-172, 2001.

LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JÚNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Possibility of vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus in neonate kids. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.553-555, 2005.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; WEISBLIT, L. et al. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *The Vet. J.*, v.183, p.328-331, 2010.

LILENBAUM, W.; SOUZA, G.N.; RISTOW, P. et al. Serological study on Brucella abortus, caprine arthritis-encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. J.*, v.173, p.408-412, 2007.

LIMA, A.L.; PAULETTI, P.; SUSIN, I.; NETO, R.M. Flutuação das variáveis séricas em cabras e estudo comparativo da absorção de anticorpos em cabritos recém-nascidos utilizando colostro bovino e caprino. *R. Bras. Zootec.*, v.38, p.2211-2217, 2009.

MADUREIRA, K.M.; GOMES, V. Prevalência da artrite encefalite caprina (CAE) em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.unifian.edu.br>> Acesso em 16 jun. 2012.

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

- MOURA SOBRINHO, P.A.; RAMOS, T.R.R.; FERNANDES, C.H.C. et al. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no Estado do Tocantins. *Ciê. Anim. Bras.*, v.11, 2010.
- PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J. et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.*, v.35, p.257–274, 2004.
- PINHEIRO, R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.133-137, 2010.
- PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, v.101, p.51-56, 2006.
- SIHVONEN, L. Studies on transmission of Maedi virus to lambs. *Acta Vet Scand.*, v.21 p.689-698, 1980.
- SIRVONEN, L; NOUTIO, L; RIKULA, U. et al. Preventing the spread of Maedi-Visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev. Vet. Med.*, v. 47, p. 213-220, 2000.
- SOUZA, K.C. et al., Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Res.* (2012a), <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.031>
- SOUZA, T.S.; PINHEIRO, R.R.; LIMA, C.C.V.; COSTA, J.N. Transmissão interespecie dos lentivírus de pequenos ruminantes: revisão e desafios. *Acta Vet. Bras.*, v.6, p.23-34, 2012b.
- TORRES-ACOSTA, J.F.J.; GUTIERREZ-RUIZ, E.J.; BUTLER, V. et al. Serological survey of caprine arthritis-encephalitis virus in 83 goat herds of Yucatan, Mexico. *Small Rum. Res.*, v.49, p.207-211. 2003.
- TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M.L. et al. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Rum. Res.*, v.57, p.73-79, 2005.
- VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C. et al. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J. Vet. Diag. Investigations.*, v.13, p.301-307, 2001.
- 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.

8 CONCLUSÕES

A técnica de IDGA apesar de apresentar vantagens por ser considerada uma prova mais acessível no que diz respeito ao custo e praticidade não é eficaz na detecção de baixos níveis de anticorpos contra o CAEV. Por outro lado, o teste de Elisa-i apresentou-se mais sensível que a prova de IDGA, devendo ser utilizado rotineiramente.

O WB por sua vez detectou precocemente anticorpos anti-CAEV quando comparado com a IDGA e Elisa-i. Embora não apresente 100% eficaz na sua sensibilidade, este revelou resultados mais confiáveis, diminuindo assim, a presença de animais falso-negativos no rebanho.

As medidas utilizadas neste estudo não foram eficazes para a erradicação da CAE, mas favoreceu uma redução significativa de animais soropositivos e conseqüentemente o seu controle.

A adoção de boas práticas de manejo é um ponto importante para o controle da CAE, sendo necessária a expansão do conhecimento dessas medidas de prevenção aos criadores.

É importante a associação de técnicas sorológicas sensíveis a técnicas moleculares em programas de controle avançado para a erradicação.

A transmissão vertical do LVPR foi evidenciada e deve ser considerada dentro do programa de controle.

9 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos forneceram informações importantes a respeito da eficácia das provas sorológicas usadas como rotina no controle da CAE. Entretanto, é necessário que as medidas de prevenção desta enfermidade sejam empregadas por um tempo maior. Ressaltando ainda a importância da utilização de métodos laboratoriais mais sofisticados para serem empregados em programas de controle desta enfermidade.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E. et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Record*, v. 115, p. 493-495, 1984.

ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L.; MCGUIRE, T. C.; GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, p. 1670-1675, 1983.

ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L., et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology*, v. 64, n. 7, p. 1656-1666, 2005.

ALVES, L. A.O; TEIXEIRA, M. F. S; PINHEIRO, A. A; PINHEIRO, R. R, DIAS, R. P; . BRITO, R. L. L; LOPES JÚNIOR, C. A. F; BEZERRA JÚNIOR, R. Q; Azevedo, D. A. A. Produção de antígeno e separação da proteína p28 por microfiltração seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina por ensaio imunoenzimático. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 4, p. 935-942, 2012

AGNARSDOTTIR, G.; THORSTEINSDOTTIR, H.; OSKARSSON, T.; MATTHIASDOTTIR, S.; HAFLIDADOTTIR, B.; ANDRESSON, O. S.; ANDRESDOTTIR, V. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of Maedi-visna virus. *Journal of General Virology*, v. 81, p. 1901-1905, 2000.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, p. 1313-1319, 2006a.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. *Protocolo para extração do DNA proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue*. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC, Comunicado Técnico. n. 72, 5 p., 2006b.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. *Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase*. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC, Comunicado Técnico. n. 50, 23 p., 2003.

ANDRIOLI, A. *Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões*. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.

ARGÜELLO A.; CASTRO, N.; ZAMORANO M. J.; CASTRO ALONSO A. & CAPOTE, J. Passive transfer of immunity in kid goats fed refrigerated and frozen goat colostrum and commercial sheep colostrum. *Small Ruminant Research*, v. 54, p. 237-241, 2004.

BLACKLAWS, B.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*.v. 101, p. 199-208, 2004.

BOMFIM, M. A. D.; BARROS, N. N.; CAVALCANTE, A. C. R. *Manejo alimentar de caprinos para a produção de leite*. In: LIMA, G. F. C.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; MACIEL, F. C.; BARROS, N. N.; AMORIM, M. V.; CONFESSOR JUNIOR, A. A. Criação familiar de caprinos e ovinos no Rio Grande do Norte. Natal: EMATER-RN, EMPARN, Embrapa Caprinos. Cap. 12. p. 279 – 297, 2006.

BORDERÍAS, M. N. P. *Seguimiento de la infección por el Virus de Maedi Visna en una explotación de ganado ovino*. 2004. 88f. Tesina de Licenciatura- Facultad de Veterinária, Universidad Complutense, Madrid, 2004.

BRÍGIDO, M. M. *Western blot: imunodeteccção de proteínas em membrana de nitrocelulose*. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. *Técnicas básicas em biologia molecular*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, Cap. 13. p. 187 – 201, 2003.

BRITO, R. L. L. *Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras*. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

CALLADO A. K. C.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; SILVA-RODRIGUES M. I. M.; PINTO- JÚNIOR, J. H. & TEIXEIRA, M. F. S. Preliminary characterization of the infection of synovial membrane cells by brazilian samples of small ruminants lentiviruses. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 2, p. 152-159, 1999.

CARNEIRO, F. F. D. *Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina*. 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

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

CARVALHO, L. F. R.; MELO, C. B.; DRUMMOND, V. O. Procedimentos para exportação e importação de material genético pelo Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 3, p. 415-422, 2007.

- CASTRO, R. S.; MELO, L. E. H. CAEV e Maedi-Visna: importância na saúde e produtividade de caprinos e ovinos e a necessidade de seu controle no Nordeste brasileiro. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 4, n. 2/3, p. 315-320, 2001.
- CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; MARTINS, A.; GOUVEIA, A. M. G. Isolamento e identificação pela imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 235-240, 1999.
- CASTRO, R. S. *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. 1998. 132 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.
- CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T.; NORTON L, K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES, D. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression in vivo. *Virology*. v. 196, p. 835-839, 1993.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clinical Microbiolgy Review*, v. 9, p. 100-117, 1996.
- CLEMENTS, J. E.; PAYNE, S. L. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Virus Research*, v. 32, p. 97-109, 1994.
- CLEMENTS, J. E.; GDOVIN, S. L.; MONTELARO, R. C.; NARAYAN, O. Antigenic variation in lentiviral diseases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 6, p. 139-159, 1988.
- 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. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology*. v. 8, p. 116-123, 1995.
- CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine Arthritis-Encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 178, p. 713-719, 1981.
- CRAWFORD, T. B; ADAMS, D. S; CHEEVERS, W. P; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v. 207, n. 29, p. 997-999, 1980.
- CRUZ, R. B; PUTINI, V. B; SANTANA, G. S; JORGE, J. S; COELHO, I; SILVA, D. L; ZACHARIAS, F; TIGRE, D; CERQUEIRA, R. B. Estudo comparativo da sensibilidade e da especificidade de elisa indireto com o teste de imunodifusão em gel de agarose no diagnóstico sorológico da artrite encefalite caprina (caev). *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2009.
- CUNHA, R. G.; NASCIMENTO, M. D. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 17, p. 72-75, 1995.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SACKS, J. M.; WEAVER, A. L. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 200, n. 6, p. 802-805, 1992.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; SCHMERR, M. J. F.; BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Veterinary Microbiology*. v. 17, p. 237-250, 1988.

DANTAS, T. V. M. *Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de Maedi-Visna Vírus em ovinos*. 2004. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

DEMARTINI, J. C.; HALSEY, W.; BOSHOFF, C.; DENNIS, Y.; HOWELL, M. D. Comparison of a Maedi-Visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 71, p. 29-40, 1999.

DONE, J. T. Eradication, elimination or control? *Veterinary Record*, v. 117, p. 253, 1985.

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 Research*, v. 10, p. 251-262, 1993.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; MADEWEL, B. R.; FLOYD, K. Serologic prevalence of Caprine Arthritis-Encephalitis virus in California goat dairies. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.190, n.2, p.182-186, 1987.

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

FEITOSA, A. L.V. L. *Análise filogenética de lentivirus de pequenos ruminantes isolados do Ceará*. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R.; Presence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology*, v. 59, p. 1515-1523, 2003.

FRANKE, C. R. *Controle Sanitário da Artrite-Encefalite Caprina*. Salvador: EDUFBA, p. 70, 1998.

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. *Journal of General Virology*, v. 66, n. 6, p. 1233-1240, 1985.

GONDA, M. A.; BRAUN, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPER, J. M.; WONG-STAAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, n. 11, p. 4007- 4011, 1986.

GONZALEZ, L.; GELABERT, J. L.; MARCO, J. C.; SAEZ-DE-OKARIZ, C. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. *Veterinary Record*, v. 120, p. 102-109, 1987.

GOUVEIA, A. M. G. *Relatório de consultoria: área sanidade animal*. Sobral, CE: Embrapa – CNPC, 122 f., 1996.

GREENWOOD, P. L. Effects of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 1 -2, n. 22, p. 71-87, 1995.

HARMACHE, A.; VITU, C.; RUSSO, P.; BOUYAC, M.; HIEBLOT, C.; PEVERI, P.; VIGNE, R.; SUZAN, M. The caprine arthritis-encephalitis virus tat gene is dispensable for efficient viral replication in vitro and in vivo. *Journal of Virology*. v. 69, n. 9, p. 5445-5454, 1995.

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

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 411- 424.

HUSO, D. L.; NARAYAN, O.; HART, G. W. Sialic Acids on the Surface of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Define the Biological Properties of the Virus. *Journal of Virology*, v. 62, n.6, p.1974-1980, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Censo agropecuário*, disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1 comunicação social, 2010, acesso em 30 de janeiro de 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho*. 2009. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=22&i=P>>. Acesso em: 12 Jun. 2012.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviruses. In: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. *Fields Virology*. 3 ed. New York: Raven Press, p. 1977 – 1996, 1996.

- JOHNSON, C. G.; BARBET, A. F.; KLEVJER-ANDERSON, P. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infection and immunity*, v. 41, n. 2, p. 657-665, 1983.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole. p. 339-343. 2000.
- JUNIOR, A. A. F; REIS, J. K. P. Vacinas contra retrovírus: modelos e desafios no desenvolvimento de vacina para HIV. *Revista eletrônica farmácia*, v. 4, p. 10-41, 2009.
- KLEVJER-ANDERSON, P.; CHEEVRES, W. P. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, v. 110, p. 113-119, 1981.
- KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, p. 1-11, 1997.
- KNOWLES, D. P.; CHEEVRES, W. P.; McGUIRE, T. C. Structure and variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis encephalitis lentivirus. *Journal of Virology*, Washington, v. 65, n. 11, p. 5744-5750, 1991.
- KNOWLES, D. P.; CHEEVERS, W. P.; McGUIRE, T. C.; STEM, T.; GORHAM, J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp 135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of Virology*. v. 64, p. 2396-2398, 1990.
- KONISHI, M.; NAGURA, Y.; N. TAKEI, M. FUJITA, K HAYASHI, M TSUKIOKA, T YAMAMOTO, K. KAMEYAMA, H SENTSUI, K MURAKAMI, Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small Ruminant Research*, v. 99, Issue 1, p. 65-71, 2011.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Research*, v. 79, p. 165-172, 2001.
- LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E. H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 6, p. 736-740, 2005.
- LEITE, E. R.; VASCONCELOS, H. E. M.; SIMPLICIO, A. A. Desenvolvimento tecnológico para o agronegócio da ovinocaprinocultura. In: SEMINÁRIO NORDESTINO DE PECUÁRIA, 4, 2000, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: Federação da Agricultura do Estado do Ceará, 2000. p. 19-33.
- LICHTENSTEIGER, C. A.; CHEEVERS, W. P. & DAVIS, W. C. CD8+ cytotoxic Tlymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis encephalitis virus. *Journal of General Virology*, v. 74, p. 2111-2116, 1993.

- LILENBAUM, W.; SOUZA, G. N.; RISTOW, P.; MOREIRA, M. C.; FRÁGUAS, S.; CARDOSO, V. S.; OELEMANN, W. M. R. A serological study on Brucella abortus, caprine arthritis-encephalitis virus and Leptospira in dairy goats in Rio de Janeiro, Brazil. *The Veterinary Journal*, Maryland Heights, v. 173, p. 408-412, 2007.
- MACKENZIE, R.; OLIVER, R.; ROONEY, J.; KAGEI, H. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis-encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 35, p. 184-186, 1987.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001, p. 145-175.
- MCGUIRE, T. C.; KNOWLES JR., D. P.; DAVIS, W. C.; BRASSFIELD, A. L.; STEM, T. A.; CHEEVERS, W. P. Transmembrane protein oligomers of caprine arthritis-encephalitis lentivirus are immunodominant in goats with progressive arthritis. *Journal of Virology*, v. 66, p. 3247-3250, 1992.
- MCGUIRE, T. C.; O'ROURKE, K. I.; KNOWLES, D. P.; CHEEVERS, W. A. Caprine Arthritis-Encephalitis lentivirus transmission and disease. *Current Topics In Microbiology And Immunology*, v. 160, p. 61-75, 1990.
- MODOLO, J. R.; STACCHISSINI, A. V. M.; CASTRO, R. S.; RAVAZZOLO, A. P. *Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina*. 1.ed. Botucatu: Cultura Acadêmica, 2003. 80 p.
- MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (maedi-visna/ artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária*, v. 14, p. 77-78, 1986.
- MOURA SOBRINHO, P. A.; RAMOS, T. R. R.; FERNANDES, C. H. C.; CAMPOS, A. C.; COSTA, L. M.; CASTRO, R. S. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 1, p. 117-124, 2009.
- MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J., FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*, v. 259, p. 67-73, 1999.
- NARAYAN, O.; JOAG, S. V.; CHEBLOUNE, Y.; ZINK, M. C.; CLEMENTS, J. E.; *Visna-maedi: the prototype lentiviral disease*. In: NATHANSON, N. (Coord). *Viral Pathogenesis*, Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997, p. 657-668.

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

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: Chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 7, p. 89-97, 1985.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFIN, D.; CLEMENTS, J. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*. v. 41, p. 67-73, 1983.

NUOTIO, L. O. *Control and eradication of viral diseases of ruminants*. 2006. 89 (Doctoral). Department of Clinical Veterinary Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

OIE. World Organisation for Animal Health. *Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres*, 2006. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: Jun/2012.

OLIVEIRA, A. A. F. Sanidade animal. In: CHAPAVAL, L.; OLIVEIRA, A. A. F.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A.; ARAÚJO, A. M.; OLIVINDO, C. S. *Manual do produtor de cabras leiteiras*. Viçosa: Aprenda Fácil, 2006. Cap. 6. p. 128- 155.

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

PAULA, N. R. O; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L.; SOUZA, K. C.; ALVES, F. S. F.; CAMPELLO, C. C.; RICARTE, A. R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 85, p. 27-33, 2009.

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

PEREIRA, M. F. *Artrite-encefalite caprina a vírus (CAE): estudo anatomopatológico e imunohistoquímico em cabras naturalmente infectadas*. 1995. 64 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1995.

PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le CAEV revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. *Revue Médecine Vétérinaire*. v. 144, p. 93-98, 1993.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA, B.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R. A.; KRAßNIG, R.; LAFONT, J. P.; LENIHAN, P.; PETURSSON, G.; PRITCHARD, G.; THORLEY, J.; VITU, C.; MORNEX, J. F.; PEPIN, M.; Routes of transmission and consequences of small

ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, v. 35, p. 257-274, 2004.

PINHEIRO, R. R. et al. avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arquivo do Instituto Biológico*, v. 77, p. 133-137, 2010.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; TORRES, A. M. C.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. Custo dos antígenos e dos testes de diagnósticos de lentivírus de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 28, p. 110-113, 2006.

PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. *Viroses de pequenos ruminantes*. Sobral: Embrapa Caprinos, 2003. 30 p. (Embrapa Caprinos. Série Documentos, 46).

PINHEIRO, R. R. *Vírus da Artrite Encefalite Caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará*. 2001. 115f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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, p. 449-454, 2001a.

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. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, n. 3, p. 421- 423, 1999.

PISONI, G.; MORONI, P.; TURIN, L.; BERTONI, G. Compartmentalization of small ruminant lentivirus between blood and colostrum in infected goats. *Virology*, v. 369, p. 119-130, 2007.

PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology*, v. 339, p. 147–152, 2005.

PUGH, D. G. *Clínica de ovinos e caprinos*. São Paulo: Roca, p. 513, 2004.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. *Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1098 – 1101, 2002.

RAVAZZOLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H.; WALDVOGEL, A.; OBEXER-RUFF, G.; PETERHANS, E.; BERTONI, G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, v. 350, p.116–127, 2006.

REILLY, L. K.; BAIRD, A. N.; PUGH, D. G. *Diseases of the musculoskeletal system*. In: PUGH, D. G. *Sheep & Goat Medicine*, 1 ed. Philadelphia: Saunders, p. 239-240, 2002.

RIMSTAD, E.; EAST, N.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DEROCK, E.; PEDERSEN, N. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis–encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, p. 1858–1862, 1993.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Immunology*. 5 ed, London: Mosby, p. 423, 1998.

ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, p. 35–53, 1999.

ROWE, J.; EAST, N. E.; THURMOND, M.; FRANTI, C.; PEDERSEN, N. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis–encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p. 2386–2395, 1992.

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. *American Journal of Veterinary Research*, v. 52, p. 510-514, 1991.

SHAH, C.; HUDER, J. B.; BONI, J.; SCHONMANN, M.; MUHLHERR, J.; LUTZ, H.; SHAH, C. A.; BÖNI, J.; HUDER, J. B.; VOGT, H. R.; MÜHLHERR, J.; ZANONI, R.; MISEREZ, R.; LUTZ, H.; SCHÜPBACH, J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and world-wide propagation through livestock trade. *Virology*, v. 319, p. 12– 26, 2004.

SILVA, J. B. A.; LIMA, P. M. Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. *Acta Veterinária Brasileira*, v. 1, n. 4, p. 111-117, 2007.

SILVA, J. G; ARAUJO, P. B; SOUSA, W. M. A; JJUNIOR, L. C. S; ALENCAR, S. P; NASCIMENTO, S. A; MONTEIRO, V. L. C; CASTRO, R. S; COELHO, M. C. O. C. *Estimativa preliminar da prevalência da artrite encefalite caprina em caprinos leiteiros do município de venturosa – Pe, Brasil. X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE.*

SILVA, J. B. A. *Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas*. 2006. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

- SILVA, R. R. *Sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil*. 1996. 38p. Monografia (Especialização em Agribusiness). Universidade Federal da Paraíba.
- SIHVONEN, L.; NUOTIO, L. O. *Control and eradication of viral diseases of ruminants*. 2006. 89 (Doctoral). Department of Clinical Veterinary Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- SMITH, B. P. *Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais*. São Paulo: Manole, p. 1138-1139, 1993.
- SOUZA, F. J. S.; OLIVEIRA, M. R.; ALMEIDA, N. C.; MARTINS, M. G.; ARAGÃO, M. E. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; GUEDES, M. I. F. Vírus do mosaico severo do caupi - CPSMV como molécula carreadora para a p28 do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina-CAEV. *Ciência Rural*, v. 35, n. 6, p.1363-1367, 2005.
- SOUZA, K. C. et al. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, (2012a), disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres>.
- TIGRE, D. M.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 5, n. 2, p. 124-131, 2006.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 6 ed, 2000, 827p.
- TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. *Small Ruminant Research*, v. 32, n. 2, p. 101-106, 1999.
- TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M. L.; ANTONINI, M.; ROSATI, S.; RUFFO, G.; MORONI, P. Correlation between milk parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. *Small Ruminant Research*, v. 57, p. 73-79, 2005.
- VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 13, n. 4, p. 301-307, 2001.
- ZANONI, R.; KREIG, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 580-582, March, 1989.

ZINK, M. C.; JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*, v. 32, p. 139-154, 1994.

ANEXOS

ANEXO 1 - Declaração do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ
Comissão de Ética no Uso de Animais



GOVERNO DO
ESTADO DO CEARÁ
Secretaria da Ciência, Tecnologia
e Educação Superior

CEUA/UVA	Certificado de Conduta Ética	CCE
----------	------------------------------	-----

Certificamos que o Protocolo nº 014.12, sob título “Análise da eficácia das medidas de controle da Artrite-Encefalite Caprina em rebanho leiteiro semi-intensivo” sob a responsabilidade de, Maria Fátima da Silva Teixeira e Apoliana de Sousa Rodrigues, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), **TENDO SIDO CONSIDERADO APROVADO PELA** Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA) em reunião realizada em 29 de agosto de 2012.

Sobral, 30 de agosto de 2012.

Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Coordenadora da CEUA/UVA
Universidade Estadual Vale do Acaraú

Reconhecida pela Portaria Nº 821/ MEC D.O.U. de 01/06/1994 Avenida da Universidade, 850 – Betânia –
CEP: 62.040-370 – Sobral – Ceará Fone: (88) 3677.4271 / FAX: (88) 3613.1866 - www.uvanet.br

ANEXO 2 - Comprovante de submissão de artigo

**FUNDAÇÃO ESTUDO PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA
FEP MVZ EDITORA**

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

CNPJ: 16.629.388/0001-24 Insc. Municipal: 302856.001-3

Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567 - 30123-970 – Belo Horizonte – MG

Fone: (31) 3409-2042 Fax: (31) 3409-2041

<http://journal.vet.ufmg.br> E-mail: abmvz.artigo@abmvz.org.br

Sr.(s): Apoliana de Sousa Rodrigues, Roberta Lomonte Lemos de Brito, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Ronaldo Pereira Dias, Samilly Mesquita Alves, Thiago Sampaio de Souza, Kelma Costa de Souza, Dalva Alana Aragão de Azevedo, Alice Andrioli, Daniele Cristina Timbó Magalhães, Maria Fátima da Silva Teixeira,

Cumpre-nos informar-lhe(s) que o artigo:

Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina

enviado para publicação nesta revista, será encaminhado para análise do Corpo Editorial desde que não haja manifestação contrária de qualquer autor do trabalho e que a taxa de submissão esteja quitada.

REG.:6303/2012

Recebido em: 21/10/2012

Atenciosamente,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia