



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

LUIS ANTONIO DE OLIVEIRA ALVES

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E SEPARAÇÃO DA PROTEÍNA P28
ATRAVÉS DE MICROFILTRAGEM SERIADA PARA
SORODIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

FORTALEZA
2011

LUIS ANTONIO DE OLIVEIRA ALVES

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E SEPARAÇÃO DA PROTEÍNA P28
ATRAVÉS DE MICROFILTRAGEM SERIADA PARA
SORODIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

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. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira

Co-orientadora: Dr^a. Alice Andrioli Pinheiro

FORTALEZA
2011

A474p

Alves, Luis Antonio de Oliveira

Produção de antígeno e separação da proteína P28 através de microfiltração seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina / Luis Antonio de Oliveira Alves. — Fortaleza, 2011.

80 p. ; il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Alice Andrioli Pinheiro.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinária) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

1. Lentivírus de Pequenos Ruminantes. 2. Elisa. 3. Antígeno. 4. CAEV. 5. Maedi-Visna I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.39

LUIS ANTONIO DE OLIVEIRA ALVES

PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E SEPARAÇÃO DA PROTEÍNA P28
ATRAVÉS DE MICROFILTRAGEM SERIADA PARA
SORODIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA.

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. Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora

Dr^a. Marcília Pinheiro da Costa
Examinadora
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Examinador
EMBRAPA Caprinos / Universidade
Estadual do Vale do Acaraú

DEDICO

*Em especial,
a você Rosângela,
porque me deste a vida,
quando chegou o tempo certo
de um encontrar o outro.*

AGRADECIMENTOS

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FUNCAP, pela bolsa concedida durante os anos do curso. A Universidade Estadual do Ceará – UECE e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – PPGCV, assim como, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA – Caprinos, que disponibilizaram as condições de infraestrutura necessárias para a concretização desta pesquisa.

E de forma particular:

Agradeço e ofereço esta dissertação a todos que me ajudaram a construí-la; não foi tarefa fácil. Acredito que o maior perigo em um agradecimento não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, a todos os meus amigos queridos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a concretização desta pesquisa, gostaria de anunciar minha profunda gratidão.

Agradeço a minha amada mãe, por ter sido o contínuo apoio em todos estes anos ensinando-me, principalmente, a importância da construção e coerência dos meus próprios valores e por ter me ensinado a arte de pensar com rigor e disciplina, propiciando-me a fundamentação básica, sem a qual este trabalho não teria sido escrito.

Agradeço também de forma muito carinhosa, a atuação do meu estimado amigo Rafael Moreira Braga, no período de construção deste trabalho. Sua paciência infinita nas correções e sua crença absoluta na capacidade de realização a mim atribuída foram, indubitavelmente, os elementos propulsores desta dissertação.

Aos meus avós Maria e Luís Oliveira que me falam com seu “saber da sabedoria” ensinando-me a coragem de prosseguir, fazendo o melhor possível.

Aos primos Weyma, Dayane, Giliano e a outra parte da querida família, que fica lá na minha bela Ibiapina, muito obrigado pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em momentos especiais nos quais gostaria de estar junto de vocês, mas que mesmo à distância fizeram chegar, de diversas formas, seus incentivos e carinhosos cuidados.

Aos amigos da Companhia de Jesus, Jerfferson Amorim, João Neto, Maurício SJ, e a todos que neste curso souberam compreender a etapa pela qual eu estava passando, entendendo minhas dificuldades e minhas ausências, buscando se aproximar de mim através da própria dissertação, agradeço-lhes carinhosamente por tudo isto.

Aos colegas de turma nas pessoas de Kalinne, Rafaela, Joanna, Lilliane, Eudson, Cássia, Elisângela, Atila, Augustinho, Mirley, Míriam e tantos outros pelo convívio, solidariedade e amizade compartilhadas todo esse tempo.

Aos “Labovirenses” Ronaldo, Rosivaldo, Kelma, Gabrielle, Dávila, Danilo, Carlos, Aryana, Apoliana e IC’s, pela cobertura direta ou indireta, que me deram nessa longa travessia. Devo dizer-lhes que aprendi com vocês a generosa solidariedade e o carinho desprendido. Por tudo, agradeço-lhes individualmente. Não poderia deixar de mencionar os estagiários e laboratoristas da EMBRAPA - Caprinos, Osmarilda, João Ricardo, Dalva, Talisson, Jamille, Diana, Felipe, Samile, que me ajudaram com seus conhecimentos e souberam tornar meu cotidiano mais leve graças ao entusiasmo e à boa vontade.

No âmbito acadêmico, gostaria de agradecer principalmente a excelência profissional da Professora Dr^a. Maria Fátima da Silva Teixeira que conferiu prestígio e valor a meu trabalho de mestrado como orientadora. Também aos Professores Dr^a Alice Andrioli e Dr. Rizaldo Pinheiro pela consideração de ter aceitado a co-orientação de minha dissertação, na esperança de retribuir, com a seriedade de meu trabalho, a confiança em mim depositada.

Incluo, de forma especial, o nome de Roberta Lomonte nesta minha lista. Foi sorte ter ela cruzado meu caminho acadêmico na etapa de experimento de mestrado. Suas ideias permearam meu trabalho.

As Doutoradas Marcília Pinheiro, Tânia Dantas, Edmara Chaves e Carla Renata, meus agradecimentos pela disposição para discutir o projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições na etapa da qualificação e defesa.

Devo agradecer também ao Professor Dr. Gustavo Hitzschky Fernandes Vieira (*in memoriam*) de modo particular às referências que me encaminhou, por tudo que me ensinou, assim como a paciência e compreensão na época em que era somente um aluno de iniciação científica com muitos sonhos a serem realizados. O senhor foi um grande mestre!

Há muito mais a quem agradecer... A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigado! Todos vocês são coautores deste trabalho.

E, finalmente, mas principalmente, a Deus, que nos ensina diariamente que a melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar é se aproximando Dele.

*"É graça divina começar bem.
Graça maior é persistir na caminhada certa.
Mas graça das graças é não desistir nunca".*

(Dom Hélder Câmara)

RESUMO

O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um lentivírus que causa uma enfermidade crônica que não possui tratamento ou vacinação como ferramenta de controle, sendo responsável por perdas econômicas significativas em todo mundo. O diagnóstico é principalmente baseado em exames sorológicos, onde os antígenos utilizados para o diagnóstico são compostos basicamente pelas proteínas estruturais p28 e gp135. Este estudo teve como objetivo produzir um antígeno (Ag) a partir de cultura de células de Membrana Sinovial Caprina (MSC) infectadas com CAEV, pela técnica de microfiltração seriada, substituindo a ultracentrifugação em colchão de sacarose (Ag UCCS) para utilização em um ELISA indireto (ELISA-i). Amostras de 188 soros caprinos, que previamente foram testados pelo Western Blot (WB) com Ag UCCS, foram submetidos à análise pelo ELISA-i com o novo antígeno produzido, que mostrou uma concordância de 92% em relação ao antígeno UCCS. A sensibilidade e especificidade do ELISA em relação ao WB foram de 95,65% e 88,5% respectivamente. A nova técnica criada a partir de microfiltrações, mostrou-se efetiva para o diagnóstico sorológico de anticorpos para CAEV em comparação ao antígeno ultracentrifugado, apresentando-se, portanto, como uma alternativa viável para produção de antígeno purificado de lentivírus de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: Lentivírus de pequenos ruminantes. ELISA. Antígeno. CAEV. Maedi-Visna.

ABSTRACT

The caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is a lentivirus which causes a chronic character disease that does not have treatment or vaccination as a control tool, being responsible for significant economical losses all over the world. The diagnosis is mainly based on serological exams, in which the antigens (Ag) used for diagnosis are basically composed by p28 and gp135 structural proteins. This study aimed to produce an antigen (Ag) from the culture of goat synovial membrane cells (MSC) infected by CAEV by serial microfiltering technique replacing ultracentrifugation in saccharose Mattress (UCCS) for the indirect diagnosis ELISA tests (i-ELISA). Samples of 188 serum from goats, previously examined by Western Blot (WB) with Ag UCCS were submitted to analysis by i-ELISA with new antigen produced, demonstrating an accordance of 92% in relation to UCCS antigen. The specificity and sensitivity relating to WB were of 95.65% and 88.5% respectively. The new technique created from the microfiltering showed itself effective to the serological antibodies diagnosis of CAEV comparing to the ultracentrifuged one, presenting itself, therefore, as to viable alternative for purified antigen of lentivirus of small ruminants.

Keywords: Small ruminant lentiviruses. ELISA. Antigen. CAEV. Maedi-Visna.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus da artrite encefalite caprina.....	25
Figura 2: Genoma do vírus da artrite encefalite caprina.. ..	26
Figura 3: Reação de precipitação de IDGA.....	28
Figura 4: Placa de poliestireno de 96 poços com amostras de soro.....	29
Figura 5: Exemplo de resultado de Western Blot. Linhas de coloração mais evidente caracterizando positividade	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Força motriz responsável pelo processo de separação com membranas	35
Tabela 2: Distribuição regional do efetivo do rebanho caprino no Brasil, 2009.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Nome
Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AgMi	Antígeno micro-filtrado
AgUCCS	Antígeno ultra centrifugado em colchão de sacarose
AIEV	Vírus da Anemia Infecciosa Equina
BIV	Vírus da Imunodeficiência Bovina
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CE	Ceará
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
CN	Controle Negativo
CT	Cultura de tecidos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
Elisa-i	Ensaio Imunoenzimático Indireto

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	gene que codifica as proteínas do envelope viral
FAO	Food and Agriculture Organization
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
x g	Unidade da força centrífuga relativa
<i>gag</i>	Gene viral que codifica as proteínas interna do vírus Glicoproteína
gp	Glicoproteína
H ₂ O ₂	Água oxigenada
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICTV	The Universal Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses
IDGA	Imunodifusão em gel de agarose
IgG	Imunoglobulina de isotipo G
KDa	Kilodaltons
L	Litro
LABOVIR	Laboratório de Virologia
LTR	Sequências longas repetidas
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
M	Molar

MA	Matriz
mA	Mili-Ampère
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul
Mg ²⁺	Magnésio
MIN	Minuto
mL	Mililitros
mM	mili-molar
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Vírus Maedi-Visna
N	Normal
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NC	Nucleocapsídeo
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OPD	O-phenylenidiamine
ORF	Pequena região do genoma viral
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Solução de tampão de fosfato

PBS-T	PBS-Tween-20
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PEG	Poli(etil)enoglicol
pH	Potencial de Hidrogênio
PM	Peso Molecular
<i>pol</i>	Gene encontrado no genoma retroviral que codifica a transcriptase reversa
PP	Percentual de positividade
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Pr	Precursor
RES	Resolução
<i>rev</i>	Gene de regulação viral
RNA	Ácido ribonucléico
RU5	Região única não traduzida na extremidade
SD	Desvio Padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SRLV	Small Ruminant Lentivirus
SU	Glicoproteína de superfície
<i>tat</i>	Gene de regulação viral

TCID	Dose infecciosa de cultura de tecido
tm	Trademark
TM	Glicoproteína Transmembrânica
TNE	Tampão Tris -HCl
TR	Transcriptase Reversa
UCCS	Ultracentrifugação em Colchão de Sacarose
UECE	Universidade Estadual do Ceará
USA	United States of America
<i>vif</i>	Gene de regulação viral
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
WB	Western Blot
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
χ^2	Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Classificação e estrutura.....	24
2.2 Transmissão e diagnóstico precoce de infecção por CAEV	27
2.3 Detecção de anticorpos	28
2.4 Detecção viral	31
2.5 Purificação de antígenos para testes sorológicos	33
2.6 Processo de separação por membranas	34
2.7 Validação de testes.....	35
2.8 Erradicação.....	36
2.9 Programa de controle	37
2.10 Eliminação total de animais positivos	38
2.11 Requisitos para o comércio internacional.....	39
2.12 Considerações finais.....	40
3. JUSTIFICATIVA	41
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	43
5. OBJETIVOS	44
5.1 Objetivos gerais	44
5.2 Objetivos específicos	44
CAPITULO I: Produção de antígeno e separação da proteína p28 através de microfiltração seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina por ensaio imunoenzimático	45
Resumo	46
Introdução.....	47
Materiais e Métodos	48
Cultivo celular e produção de antígeno	48
Purificação por microfiltração seriada.....	49
Dosagem de proteína total, SDS-PAGE e Western Blot (WB)	49

Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)	50
Padronização de um Elisa indireto (Elisa-i)	51
Amostras e ponto de corte	52
Resultados.....	52
Purificação, concentração e dosagem de proteínas.....	52
SDS-PAGE e Western Blot.....	53
Ensaio Imunoenzimático	54
Discussão	55
Conclusão.....	57
Agradecimentos.....	57
Referências	58
6. CONCLUSÕES	64
7. PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXOS.....	77
Anexo 1: Declaração do Comitê de Ética	78
Anexo 2: Declaração da EMBRAPA ao Comitê de Ética.....	79
Anexo 3: Comprovante de submissão de artigo	80

1. INTRODUÇÃO

As lentivirose são enfermidades de caráter crônico que não possuem tratamento ou vacinação como ferramenta de controle. São doenças lentas e progressivas causada por um lentivírus que acometem caprinos e ovinos independentemente de idade, sexo e raça, provocando assim queda na produtividade e perdas econômicas significativas, além de ser um forte fator limitante para o comércio internacional.

Dentre as lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR), destacam-se o Vírus Maedi Visna (MVV) e o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), que, de acordo com os apontamentos de Quinn et al., (2005), estão intimamente relacionados e causam infecções persistentes e síndromes similares, devido a existência de um grupo de hospedeiros variáveis e de diferentes capacidades patogênicas.

Os LVPR provocam infecções persistentes, caracterizadas por realizar replicação em células do sistema monócito-fagocitário, perdurando no interior dos monócitos e macrófagos por um intervalo de tempo prolongado, do momento da infecção até o aparecimento dos sintomas (PASICK, 1998). Difundem-se nos rebanhos mundiais e têm sido motivo de restrições no comércio internacional, principalmente devido às características da infecção persistente e geralmente assintomática. Devido a esse fato, o diagnóstico baseado no exame clínico é limitado, sendo necessária a detecção de anticorpos específicos por testes sorológicos.

Quinn et al., (2005) em seus estudos apontaram que raramente são observados sinais em animais com menos de dois anos de idade, devido ao curso lento dos lentivírus. A sintomatologia precoce é percebida por: intolerância ao exercício, dispnéia, com perda das condições físicas pelo agravamento da doença, a despeito de apresentarem bom apetite. Esses sinais quase sempre podem ser observados após períodos de estresse, esforço e clima desfavorável, podendo durar de três a seis meses ou persistirem ao longo dos anos. As manifestações podem ser

articulares, neurológicas ou respiratórias (BLOOD; RADOSTITS, 1991; BELKNAP, 2005).

Os principais testes sorológicos empregados para detecção de anticorpos contra lentivírus são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), ensaio imunoenzimático (ELISA), western blot e imunoprecipitação (BLOOD; RADOSTITS, 1991; BELKNAP, 2005).

Dentre os testes disponíveis, o IDGA é de longe o mais amplamente utilizado para o diagnóstico de infecção por MVV e CAEV (HOUWERS et al., 1988; KNOWLES et al., 1990). Este, no entanto, possui algumas desvantagens, como por exemplo, ser uma técnica pouco sensível na detecção precoce em níveis mais baixos de anticorpos (KWANG et al., 1993; KEEN et al., 1995; MC CONNELL et al., 1998).

Alternativamente, tem-se utilizado, o ELISA indireto por ser uma técnica mais precisa do que o IDGA e que possibilita o exame de grande número de amostras, porém, este apresenta desvantagens, como custo de produção e a necessidade da utilização de antígenos mais puros do que os empregados no IDGA, assim como estrutura laboratorial mais sofisticada para produção destes (AKERSTROM et al., 1985; PINHEIRO et al., 2010). A utilização dessas técnicas combinadas de diagnóstico para detecção dos lentivírus, podem auxiliar na definição do status do rebanho para a implementação de medidas de controle mais eficientes, com monitoramento periódico dos animais (sorologia semestral), separação e/ou eliminação dos positivos, adoção de práticas de manejo que diminuam o risco de transmissão do vírus, especialmente das crias, prevenindo a disseminação dessa enfermidade nos rebanhos (CALLADO et al., 2001; FROTA et al., 2005).

Com o surgimento dos primeiros relatos de casos da síndrome (Artrite Encefalite Caprina) CAE e do isolamento e identificação do vírus como o agente promotor, os pesquisadores vêm perquirindo um maior conhecimento da doença, como a comprovação das formas de transmissão e os métodos laboratoriais capazes de acolitar no diagnóstico e controle da infecção (BRITO, 2009).

No tocante a purificação de antígenos para padronização do teste ELISA, muitos protocolos são utilizados. Estes empregam, de forma simples ou combinada, as seguintes técnicas: centrifugação simples, centrifugação e ultracentrifugação em gradiente contínuo ou descontínuo de sacarose, filtração pressurizada, cromatografias de troca-iônica e de afinidade, concentração e precipitação com polietilenoglicol 8.000 (PEG 8.000) (HOUWERS et al., 1982, ARCHAMBAULT et al., 1988; SIMARD e BRISCOE, 1990a; SIMARD e BRISCOE, 1990b; ZANONI et al., 1994; SIMARD et al., 2001; PINHEIRO, 2001). Contudo, a maioria destes protocolos são demorados e onerosos já que possuem várias etapas de processamento e requerem uma construção laboratorial sofisticada. O ELISA tornou-se, portanto, muito utilizado devido ao seu alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade, porém o antígeno importado, tem dificultado o uso do teste como método de rotina pelo alto custo dos kits de diagnóstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação e estrutura

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), incluindo o Vírus Maedi Visna (MVV) de ovinos e o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), pertencem à família Retroviridae, são complexos não oncogênicos, e são intimamente relacionados fenotípica, biológica e antigenicamente, o que os insere no conceito de *quasispecies* virais (PASICK, 1998). Causam uma doença inflamatória sistêmica, debilitante, incurável e de caráter crônico (SHAH et al., 2004). Foram primeiramente isolados por Sigurdson, (1954) em ovinos quando o autor consagrou o termo “vírus lentos”, devido a infecção crônica de evolução lenta, progressiva, persistente e degenerativa.

Vários outros vírus de importância veterinária e humana também estão incluídos neste gênero, como os vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV), e das imunodeficiências humana (HIV), bovina (BIV), felina (FIV) e símia (SIV). Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples hospedeiro, levando a sérios problemas ou à morte; infectam e integram o seu genoma aos das células, e normalmente a ativação celular é que promove multiplicação eficiente do vírus; infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multi-sistêmica (AIEV, MVV e CAEV), associada a síndromes de imunodeficiência (SIV, HIV e FIV); e apresentam alta taxa de mutação, com conseqüente diversidade genotípica, fenotípica e antigênica (PINHEIRO, 2001).

O CAEV, como os demais lentivírus apresenta-se como vírion envelopado, com diâmetro de 80 a 100 nm, núcleo cônico e denso, contendo duas moléculas idênticas de RNA fita simples, não complementares, unidas por pontes de hidrogênio, de polaridade positiva, com aproximadamente 9000 a 10000 pares de bases, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo. O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias (TM) e de superfície (SU). A matriz (MA) também é outra

estrutura presente na partícula viral e está situada entre o capsídeo e o envelope (Figura 1).

São pleomórficos, esféricos e têm uma densidade de 1,14 a 1,18 g/mL apresentando uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície (FEITOSA, 2007), que acarreta um grau de resistência à degradação do vírus pelas enzimas proteolíticas e à neutralização do agente por anticorpos, aumentando, assim, a resistência do vírus perante às enzimas do trato digestivo e à resposta humoral o que facilita a persistência da infecção (HUSO et al., 1988).

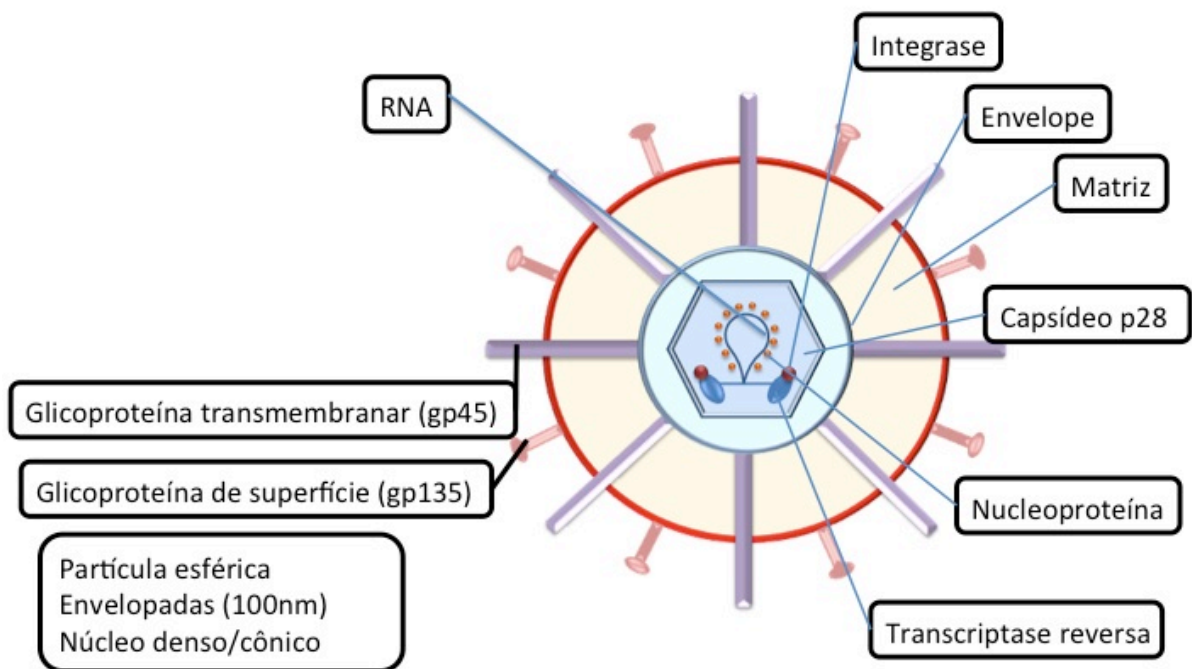


Figura 1: Estrutura do vírus da artrite encefalite caprina. (COFFIN, 1996) Adaptado.

É composto pelos genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*), genes de regulação (*tat*, *rev* e *vif*) e por duas regiões não traduzidas, únicas, situadas nas extremidades 5' (RU5) e 3'(RU3), que apresentam elementos promotores da transcrição do RNA viral (Figura 2). O DNA proviral resultante da retrotranscrição apresenta duas regiões terminais não codificadoras (LTR – *long terminal repeat*). Os genes estruturais dispostos da extremidade 5' para 3' do genoma são *gag*, *pol* e *env*, além de pequenas ORF (*open reading frames*): *tat*, *rev* e *vif* codificadoras para proteínas reguladoras (PINHEIRO, 2001).

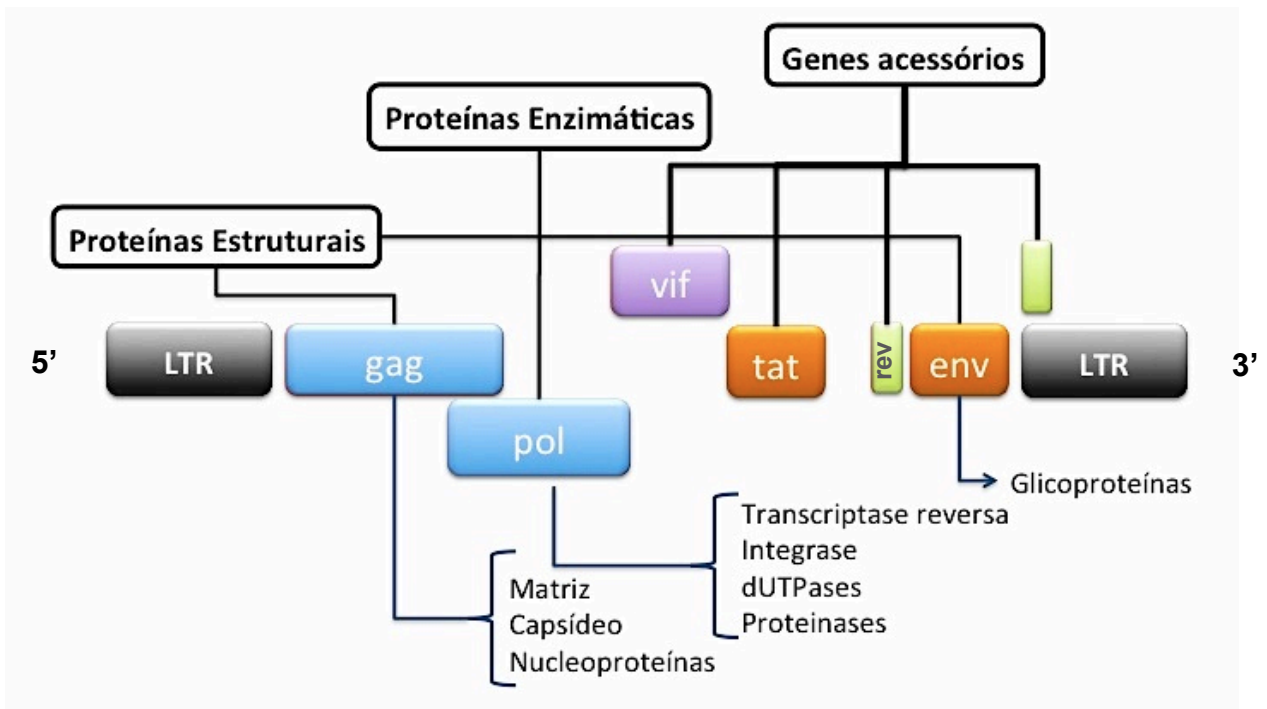


Figura 2: Genoma do vírus da artrite encefalite caprina. (PINHEIRO 2001) Adaptado.

2.2 Transmissão e diagnóstico precoce de infecção por CAEV

Caprinos infectados funcionam como reservatório e fonte de infecção do vírus. A transmissão ocorre por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário, principalmente macrófagos, caracterizado pelo tropismo peculiar do vírus por estas células (GORREL et al., 1992). A replicação viral acontece nos macrófagos produzindo lesões do tipo inflamatória. No entanto, outros tipos de células, como fibroblastos, células epiteliais e células endoteliais também são suscetíveis à infecção *in vivo* (CARROZZA et al., 2003).

A principal via de transmissão que corresponde a um total de 69% segundo os apontamentos de Rowe et al. (1991) é a digestiva, geralmente, no período neonatal, através do leite e ou colostro de cabras infectadas, onde o vírus pode se encontrar tanto livre como em células somáticas. A infecção dos cabritos pode ocorrer pelo contato vaginal com a cria, ingestão acidental de colostro de cabras infectadas ou transmissão pela mãe para cria através da saliva ou secreções respiratórias durante a limpeza do neonato (ROWE; EAST, 1997).

Por ser de evolução geralmente crônica, o diagnóstico precoce é indispensável para uma estratégia de prevenção e controle eficiente, que não deve ser baseada em sinais clínicos, já que eles podem aparecer muito tardiamente e não são específicos. A infecção acomete os caprinos independentemente de sexo, raça e idade, apesar de relatos indicarem maior prevalência em raças caprinas leiteiras (PINHEIRO, 2001). Geralmente assintomática, pode causar afecção multissistêmica, com manifestações clínicas de pneumonia, artrite, mamite ou encefalite, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte (NARAYAN; CORK 1985; CUTLIP et al., 1988). Dentre estas formas, a mais comumente observada é a artrítica, acometendo animais adultos (CRAWFORD; ADAMS, 1981). O aparecimento de uma ou de outra das formas clínicas pode depender das condições do manejo praticado na propriedade.

2.3 Detecção de anticorpos

Os esforços para encontrar um padrão ouro no diagnóstico sorológico de LVPR têm sido infrutíferos. Imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e, mais recentemente, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) são os testes internacionalmente prescritos (OIE, 2004). O IDGA é o teste padrão recomendado pela (OIE), possui baixo custo, fácil leitura e resultado rápido. Tem boa especificidade e sensibilidade razoável, e é uma técnica que se fundamenta na difusão do anticorpo (Ac) e do antígeno (Ag) em uma base semi-sólida contendo gel de ágar e eletrólitos (Figura 3). O teste de IDGA é bastante eficiente para CAEV e MVV devido à semelhança antigênica que esses vírus possuem. Sua especificidade e sensibilidade variam dependendo do tipo de antígeno utilizado (CRAWFORD et. al., 1980). Quando o Ac e o Ag se encontram em concentrações equivalentes, interagem e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como bandas de precipitação (BRITO, 2009).



Figura 3: Reação de precipitação de IDGA. Fonte: Arquivo próprio.

O ELISA é outro teste recomendado pela OIE. Este permite o processamento de um grande número de amostras além de poder ser usado tanto o soro sanguíneo quanto o leite (PLAZA et al., 2009). Se baseia na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividade tanto imunológica como enzimática. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e insolubilizado sobre um suporte, a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e poderá facilmente ser revelada mediante a adição de um substrato específico, que sob ação da enzima produzirá uma cor observável a olho nu e quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro (PINHEIRO 2001) (Figura 4).

É mais sensível e específico que o IDGA, como mostram os estudos feitos por CRUZ et al., (2009), onde a sensibilidade e especificidade do ELISA indireto são de 93,93% e 100%, respectivamente, enquanto do IDGA, 45,83% e 93,33%, respectivamente.

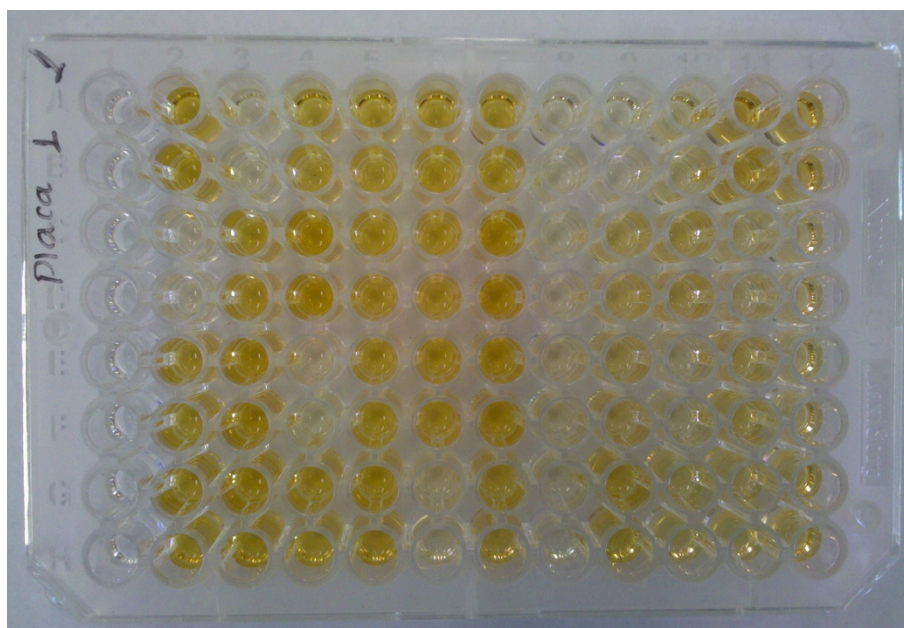


Figura 4: Placa de poliestireno de 96 poços com amostras de soro. Fonte: Arquivo próprio.

Uma desvantagem do IDGA é a subjetividade da interpretação das linhas de precipitação, mesmo como a impossibilidade de utilização de outro material que não seja o soro sanguíneo (REINA, 2009). Além disso, há mais de trinta relatórios na literatura sobre testes utilizando ELISA para LVPR, mostrando sua importância no diagnóstico da infecção nos rebanhos estudados (de ANDRÉS et al., 2005). Porém, a sua sensibilidade depende do antígeno utilizado e do segundo anticorpo ou conjugado (BRITO, 2009).

Vários testes de ELISA, indireto ou competitivo, utilizando vírus, proteínas recombinantes e ou peptídeos sintéticos foram produzidos (de ANDRÉS et al., 2005), mas poucos ensaios foram avaliados internacionalmente (BRINKHOF; VAN MAANEN, 2007 ; TOFT et al., 2007). Antígenos utilizados para estes métodos laboratoriais são geralmente extraídas e purificadas de cultura de tecidos (CT) de células infectada, usando a manipulação complexa e ou equipamentos caros para as etapas de purificação.

No Brasil, o programa nacional para controle de lentivirus de pequenos ruminantes, utiliza como diagnóstico de rotina o IDGA, usando o ELISA, WB e PCR para certificação de alguns casos duvidosos.

O WB baseia-se na formação de um complexo antígeno-anticorpo que é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático, ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação (BJERRUM; HEEGAARD, 1988) (Figura 5). É uma técnica laboriosa e demorada, já que precisa do processo de eletroforese para separação das proteínas antes que ocorra a transferência para a membrana de nitrocelulose (PINHEIRO, 2001).

É importante também salientar que os testes sorológicos necessitam ser repetidos semestralmente ou sempre que possível pelo criador, porém devem ser realizados preferencialmente em caprinos com mais de quatro meses de idade, pois antes deste período pode haver influência dos anticorpos maternos (OLIVEIRA, 2006).

Esses exames são necessários para que seja feita a adoção de medidas de controle como a separação ou descarte dos animais.

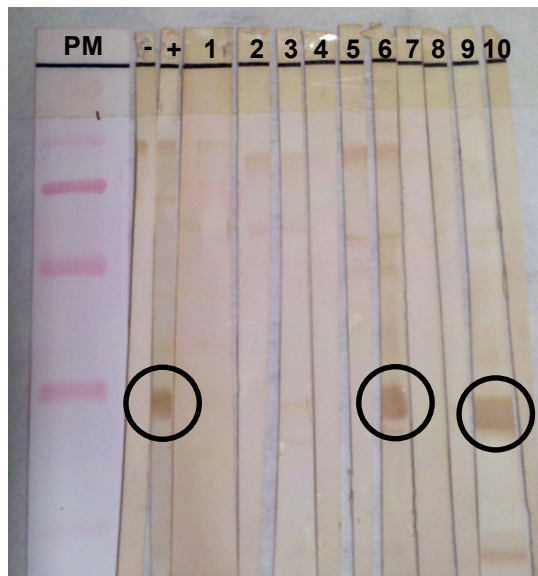


Figura 5: Exemplo de resultado de Western Blot. Linhas de coloração mais evidente caracterizando positividade. Fonte: arquivo próprio.

2.4 Detecção viral

Os avanços na biotecnologia durante as últimas décadas proporcionaram a utilização ilimitada de técnicas de biologia molecular no diagnóstico e estudos de sequenciamento e expressão de vários genes específicos. Essa nova e revolucionária metodologia, baseada na amplificação de DNA *in vitro*, consiste em uma reação de polimerização em cadeia (polymerase chain reaction - PCR), na qual se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial (SILVA, 2003).

A técnica de PCR é tão sensível que uma única molécula de DNA pode, em teoria, servir como molde para amplificação. Assim, o gene presente no genoma como cópia única pode ser amplificado a partir de DNA genômico complexo, podendo ser posteriormente visualizado como banda discreta, constituída por moléculas de DNA, por meio de eletroforese em gel de agarose (SILVA, 2003).

A reação em cadeia da polimerase utiliza enzima DNA polimerase termoestável, sendo realizada em um aparelho denominado termociclador, que

permite a repetição de ciclos de diferentes temperaturas, nas quais as três fases da PCR (desnaturação, anelamento e extensão/polimerização) ocorrem em cadeia (SILVA, 2003).

A PCR tem sido frequentemente utilizada para complementar os métodos sorológicos, uma vez que resultados positivos de PCR foram obtidos em animais soronegativos (de ANDRÉS et al., 2005; GONZALEZ et al., 2005).

Cabras naturalmente contaminadas com o vírus podem expressar o DNA pró-viral em diferentes tecidos do seu trato genital como útero e ovidutos, como também em células *cumulus oophorus* (ALI AL AHAMAD et al., 2005), em células do córtex ovariano, em folículos pré-antrais ovarianos (SILVA, 2006) e em ovócitos e no fluido uterino (CAVALCANTE, 2011), sendo que a presença do vírus nestes, pode contribuir para uma transmissão vertical da enfermidade (FIENI et al., 2002).

Até agora, células mononucleares do sangue periférico são a principal fonte de DNA. Leite, colostro, sêmen e líquido sinovial apresentam menor sensibilidade e são menos confiáveis como fonte de DNA para análise de LVPR por PCR (EXTRAMIANA et al., 2002 ; de ANDRÉS et al., 2005; PISONI, 2006).

Alguns sistemas, com iniciadores derivados das sequências dos genes *gag* ou *pol*, foram desenvolvidos para detecção de DNA proviral ou RNA viral em leucócitos, células do leite, lavados brônquio-alveolares, líquidos sinoviais e células obtidas por tripsinização de monocamadas ou explantes (REDDY et al., 1993; RIMSTAD et al., 1993; BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995, CHEBLOUNE et al., 1996; RUSSO et al., 1997; CASTRO, 1998), como alternativa para aumentar a quantidade do produto amplificado e permitir sua visualização pela coloração com brometo de etídio, através da Nested-PCR (BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995).

A detecção da infecção por LVPR através da PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da sequência-alvo e da especificidade do iniciador. Entretanto, devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que a técnica seja

empregada somente para esclarecer resultados sorológicos indefinidos ou negativos (KNOWLES, 1997).

2.5 Purificação de antígenos para testes sorológicos

De acordo com o trabalho de Flores (2007), as infecções víricas induzem uma resposta imunológica específica, que persiste por um tempo variável e que pode ser detectada por diversas técnicas. Os anticorpos produzidos contra um determinado vírus são estritamente específicos para este agente. Por isso, as técnicas de detecção de anticorpos são também específicas, permitindo distinguir a resposta sorológica produzida contra diferentes vírus. Sendo assim, metodologias usadas na produção e purificação de antígenos para exames de diagnósticos podem influenciar em sua sensibilidade e especificidade podendo ou não ser capazes de detectar quantidades mínimas de anticorpos e de identificar quase a totalidade dos animais que os possuem (CELER; CELER, 2001).

Muitos protocolos de produção e purificação de antígenos para diagnóstico vêm sendo desenvolvidos. Houwers et al., (1982) produziram antígeno para teste de ELISA a partir de cultura de células de plexo coróide ovino infectadas com Maedi-Visna (ZZV-1050) utilizando centrifugação a 8.500 xg *overnight*, seguida de uma centrifugação em gradiente contínuo de sacarose (25%) e tratamento com éter. Archambault et al., (1988) descrevem em seu trabalho, um protocolo para produção de antígeno CAEV, onde este antígeno foi concentrado 100 vezes por filtração pressurizada, e, em seguida, submetido à centrifugação em gradiente descontínuo de sacarose (17-55%), dentre outros. Entretanto, durante o processo de purificação das proteínas dos lentivírus para produção de antígenos, podem ocorrer perdas principalmente das glicoproteínas (*gps*) por serem relativamente instáveis (RIMSTAD et al., 1993), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde podem haver perdas de até 50% das proteínas virais (MCGRATH et al., 1978).

Desta forma, a validade de um teste diagnóstico pode ser estimada com base em seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), que são próprios do teste e não sofrem influência da prevalência da enfermidade para a qual se destina seu uso (ASTUDILLO; KANTOR, 1981).

2.6 Processo de separação por membranas

A filtração pode ser definida como a separação de dois ou mais componentes, de um fluxo de fluido. Em outras palavras, ela se refere à separação sólido-fluido, onde se força o fluido a atravessar um material poroso que retém um determinado sólido. A membrana atua como barreira seletiva permitindo a passagem de certos componentes, e retém outros, de uma mistura. Como consequência, tanto a fase que permeia, como a fase retida, são enriquecidas em um ou mais componentes. Laksminarayanaiah, (1984) define membrana, como uma “fase que age como uma barreira para prevenir o movimento mássico, mas permite restringir ou regular a passagem de uma ou mais espécies através dela”.

A ultrafiltração para Noble e Stern, (1995) pode ser dividida em: filtração convencional “dead-end”, onde o fluido escoia perpendicularmente através da membrana filtrante, fazendo com que os solutos se depositem sobre a superfície; e filtração tangencial “cross-flow”, onde a solução de alimentação flui paralelamente à membrana e o fluxo de permeado, perpendicularmente, o que permite o escoamento de grandes volumes de fluidos.

Destarte, os processos de separação por membranas podem ser classificados quanto ao princípio de operação e fenômenos envolvidos, ou então, como mostrado na (Tabela 1) através da força motriz promotora da separação (PAULSON, 1984).

Tabela 1: Força motriz responsável pelo processo de separação com membranas

Processos com Membranas	Força Motriz na Separação
Osmose Inversa	Diferença de pressão
Microfiltração	Diferença de pressão
Ultrafiltração	Diferença de pressão
Pervaporação	Diferença de pressão (vácuo)
Diálise	Diferença de concentração
Eletrodiálise	Diferença de potencial elétrico

(HABERT, 1997) Adaptado.

Especificamente, a purificação de proteínas para CAEV pode ser dividida em quatro etapas genéricas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultura (clarificação); concentração e ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e finalmente, operações para acondicionar o produto final (PESSOA JR ; KILIKIAN, 2004).

2.7 Validação de testes

A validação e desenvolvimento de testes sorológicos é um processo difícil que consiste em pelo menos cinco estágios: 1) Aplicabilidade; 2) Otimização e padronização; 3) Determinação de sensibilidade e especificidade; 4) Monitoramento de desempenho contínuo e 5) Manutenção dos critérios de validação no uso rotineiro (OIE, 2006).

Um teste, para que seja utilizado como diagnóstico confiável, deve ser validado e padronizado, já que a validação fornece resultados consistentes para que se identifiquem verdadeiramente os animais positivos e negativos para uma análise, além de prever o *status* de infecção com confiabilidade estatística. Um teste pode ser reconhecido, se as estimativas para uma dada população já tiverem sido medidas por um exame de referência “*gold standard*”, que servirão de resultado molde para confirmação do novo protocolo em estudo (OLIVEIRA, 2007).

2.8 Erradicação

Após o sucesso da erradicação do MVV na Islândia (PETERHANS et al., 2004), os regimes de controle têm sido amplamente aplicados em países europeus, incluindo: Finlândia, Bélgica, Dinamarca, França, Noruega, Suécia, Suíça, bem como nos Estados Unidos e Canadá (NUOTIO, 2006). Assim como no Brasil e países membros do MERCOSUL, de acordo com a resolução, MERCOSUL/GMC/RES Nº 06/09.

Devido o vírus da Artrite-Encefalite Caprina encontrar-se associado às células do sistema monocítico-fagocitário, presentes no sangue, colostro, leite entre outros espécimes biológicos (PAULA, 2009), a pesquisa sobre os modos de transmissão desse vírus, é fundamental para o delineamento de medidas eficientes para o controle e possível erradicação (ANDRIOLI et al., 2006).

As perdas econômicas causadas por qualquer uma das formas clínicas (artrítica, pulmonar, mastite e nervosa) são expressivas, principalmente por diminuir a vida produtiva do animal com redução gradativa da produção de leite, a eficiência reprodutiva, predispondo a glândula mamária às infecções e favorece assim, a desvalorização dos animais infectados no ato da comercialização (BOHLAND; D'ANGELINO, 2005; STACCHISSINI et al., 2007; GREGORY et al., 2009).

A diminuição da prevalência de LVPR diminui a incidência da infecção clínica e evita perdas direta de matrizes e crias. Além disso, melhora o bem-estar animal e de produção, diminui o abate e elimina custos veterinários desnecessários. Destarte, inseminações artificiais e trocas de animais entre criações são permitidas quando se alcança o *status* de rebanho livre para LVPR, evitando assim que o vírus se dissemine, aumentando o valor dos mesmos (REINA, 2009).

2.9 Programa de controle

A determinação da prevalência da doença deve ser a ação inicial em qualquer esquema de erradicação. Posteriormente, o objetivo deverá ser a diminuição de soroprevalência e, finalmente, enumerar metas para erradicar a infecção (PETERHANS et al., 2004). IDGA e ELISA, com o Western Blot como técnica de confirmação sorológica, podem ser aplicados para consolidar o diagnóstico, além da separação ou descarte dos animais soropositivos (FEITOSA, 2007). Rebanhos precisam ser monitorados pelo menos uma vez por ano, através de um teste confiável e sensível, começando com animais acima de 6 meses de idade (REINA, 2009).

Um programa de controle específico, adaptado para a criação do sistema, deve ser escolhido. Após testes periódicos, os rebanhos devem ser classificados de acordo com a soroprevalência, por exemplo, alta (> 70%), intermediária (40-69%), baixa (10-39%), muito baixa (1-9%) e negativa (livre de LVPR). As estratégias mais eficientes e econômicas devem ser desenvolvidas para facilitar a diminuição na prevalência e alcançar o *status* livre de LVPR (NUOTIO, 2006).

Ambos, MVV e CAEV, devem ser controlados conjuntamente, a fim de evitar a propagação viral entre os rebanhos. Em criações mistas, os cordeiros não devem ser alimentados com leite de cabra em massa, porque isso pode levar à transmissão de espécies cruzadas e transmissão horizontal por aerossóis infectados (PETERHANS et al., 2004). Fatores ligados ao manejo do rebanho têm forte influência na disseminação da doença, sendo a prevalência da CAE maior em países onde os animais são criados de forma intensiva. A utilização de armazenamento do colostro e ou leite de várias cabras para alimentar os cabritos, tem sido associada ao aumento da prevalência de CAE (PINHEIRO, 2001).

De acordo com os apontamentos de Carneiro, (2011), no semiárido nordestino, a criação de pequenos ruminantes é uma das mais importantes atividades produtivas, uma vez que no Nordeste existem cerca de 8,3 milhões de caprinos, que correspondem a 90,61% do total do rebanho brasileiro (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição regional do efetivo do rebanho caprino no Brasil, 2009.

	Nº Cabeças	% do Rebanho Total
Norte	177.377	1,94
Nordeste	8.302.817	90,61
Sudeste	231.781	2,53
Sul	335.720	3,66
Centro-Oeste	115.865	1,26
Brasil	9.163.560	100

Fonte: IBGE (2009). Adaptado.

Um laboratório de referência para LVPR deve ser estabelecido em cada região para realização e coordenação de ensaios, a fim de determinar a soroprevalência da infecção. O laboratório deve participar também na atualização da legislação sobre erradicação e aplicação de medidas restritivas ao comércio exterior e no interior do país, através do envolvimento com a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE).

Finalmente, o laboratório de referência deve patrocinar e avaliar testes de comparação internacional e fornecer documentação de credenciamento (REINA, 2009). Para tanto, a otimização de protocolos e diminuição nos custos derivados da produção de antígenos para realização dos testes são imprescindíveis.

2.10 Eliminação total de animais positivos

O abate de rebanhos infectados e a substituição por animais sem lentivíroses foi a estratégia eficaz no controle da epidemia na Islândia (BLACKLAWS et al., 2004). O abate pode ser aplicado eficientemente em áreas com baixa prevalência ou onde apresente um número relativamente baixo de animais (<1 milhão). Países como a Polônia, Suíça, Bélgica e Malta, de acordo com dados do censo de 2005, são exemplos. Obviamente, o abate não pode ser facilmente e

sistematicamente aplicado em países com alta prevalência e ou envolvendo milhões de animais como no Reino Unido e Espanha, onde se estima possuir uma população superior à 22 milhões de ovinos. Outros exemplos: Itália e Romênia (> 7 milhões de ovelhas); Grécia, Espanha e França (> 5, 2 e 1 milhão de caprinos, respectivamente) (BLACKLAWS et al., 2004).

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma infecção crônica e incurável que tem causado significativas perdas aos produtores, porque as medidas de controle severas, como o sacrifício dos animais diagnosticados como positivos, têm sido um desafio permanente, principalmente quando afeta reprodutores e matrizes de alto valor genético (ANDRIOLI et al., 2006), podendo revogar todos os ganhos feitos por programas de seleção genética (LUJÁN et al., 1993).

No Brasil, propriedades com prevalência de 5 a 10%, considerada baixa, recomenda-se a erradicação do problema com o abate dos caprinos doentes, quando a prevalência é acima de 10%, considerada alta, pode-se optar pela manutenção dos animais de elevado valor zootécnico, desde que sejam identificados e isolados dos demais, por exemplo, com colares ou brincos diferentes dos soronegativos, para facilitar a visualização dos mesmos, para que sejam mantidos sob rigorosa vigilância (BRITO, 2009).

2.11 Requisitos para o comércio internacional

A OIE, assim como a resolução dos requisitos zoonosológicos dos estados partes para a importação de caprinos para reprodução ou engorda MERCOSUL/GMC/RES Nº 06/09 recomenda que os animais não devam apresentar sinais clínicos característicos para CAE ou MVV no dia do embarque.

Animais com mais de um ano de idade devem ser testados laboratorialmente para CAE, mostrando resultados negativos, trinta dias antes do embarque. E, no que tange à inseminação artificial, uma confirmação para reação soronegativa deve ser realizada pelo menos duas vezes por ano. Já que segundo os estudos feitos por Andrioli et. al., (2006) e confirmados por Reina, (2011) sêmen de caprinos e ovinos

infectados podem verter os vírus, podendo transmitir assim, CAEV/MVV para fêmeas susceptíveis. Se estas condições não forem satisfeitas, o sêmen não deve ser exportado, sendo, portanto, destruído.

2.12 Considerações finais

Estratégias de prevenção destinadas aos cuidados são necessárias para evitar a disseminação de LVPR. Uma vez que são detectados focos de infecção, a estimativa de prevalência, bem como a compreensão do sistema de criação e as condições de gestão, são essenciais antes de se implementar qualquer programa de controle. Um melhor conhecimento dos riscos de transmissão e do papel relativo do leite versus transmissão horizontal é necessário. Estratégias de prevenção devem ser aplicadas de forma contínua e progressiva. Uma fase final seria a certificação de rebanhos livres de lentivirose, abrindo possibilidades para programas locais e internacionais.

3. JUSTIFICATIVA

Dentre as doenças infecciosas, a CAE tem sido motivo de preocupação para os produtores, por ser considerada de difícil controle, em decorrência principalmente da sua disseminação em criações de alto padrão genético e da inexistência de vacinas embora vários estudos tenham sido realizados com esta finalidade. Além disso, o crescente risco da importação indiscriminada de animais de outras regiões, sem a necessária certificação para CAE, pode resultar na ocorrência de novas variantes dos vírus, trazendo maiores prejuízos aos criadores (CALLADO et al., 2001).

A preocupação com o estado sanitário dos rebanhos vem sendo intensificada devido às exigências sanitárias para o comércio de caprinos e seus produtos. Dessa forma, a certificação de rebanhos como negativos para determinadas doenças pode resultar na agregação de valor aos animais e seus produtos, já que enfermidades infecciosas como a CAE podem promover a redução da produção leiteira, dos níveis de gordura e de proteína do leite de cabras infectadas; redução do período de lactação; e a elevação da taxa de mortalidade das crias. (SIMPLÍCIO, 2001; BRITO 2009).

Devido à alta prevalência da doença em caprinos puros leiteiros, é sugerido que as criações negativas para CAE sejam certificadas, enquanto que nas soropositivas sejam implementadas voluntariamente medidas estratégicas de controle. Como consequência, os animais dos rebanhos certificados podem apresentar maior valor de mercado e facilidade para venda, tendo os compradores maior segurança quanto ao *status* sanitário dos animais adquiridos para reprodução (CALLADO et al., 2001).

Vale salientar que devido à fase precoce da infecção, vários animais infectados, mesmo aparentemente saudáveis, são soronegativos por períodos bastante variados, podendo apresentar soroconversão tardia, inexistência ou baixa produção de anticorpos não detectáveis pelo IDGA, por amostras virais pouco indutoras de resposta humoral, ou ainda, pela tolerância ao vírus, possibilitando a

disseminação deste nos rebanhos caprinos (ADAMS, 1982; RIMSTAD et al., 1993; BRODIE et al., 1998; TIZARD, 1998).

Alternativamente ao IDGA foram padronizados alguns métodos de detecção de anticorpos por Ensaio Imunoenzimático, capazes de identificar uma maior porcentagem de animais infectados ou suspeitos para CAEV, por ser uma técnica mais sensível. Assim, o ELISA, tem sido considerada uma técnica potencial no diagnóstico das lentivirose para animais com sorologia negativa ou dúbia ao IDGA.

Destarte, o desenvolvimento de um teste acessível menos oneroso em relação aos *kits* ELISA disponíveis, poderá contribuir para caracterização e estabelecimento das propriedades como livres e para avaliação das falhas e melhorias das medidas de controle adotadas, com conseqüente valorização dos rebanhos e seus produtos de multiplicação animal (matrizes, reprodutores, sêmen e embriões). Além disso, poderá surgir o interesse ou a necessidade de outros produtores locais, da implantação de medidas de políticas sanitárias mais rigorosas, minimizando, assim, as perdas nas criações e a disseminação dos vírus entre os animais, de forma a possibilitar um controle futuro maior dos LVPR.

Existem vários testes diagnósticos para CAEV, inúmeras estratégias de elaboração de antígenos eficazes têm sido descritas, apesar disto, comercialmente, existem poucas opções, que em sua maioria, são muito onerosas e dificultam o controle estratégico da doença com cepas autóctones.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A produção de antígeno por microfiltração torna a metodologia mais acessível para uso da técnica de ELISA, como diagnóstico para lentivirose de pequenos ruminantes, quando comparado a outras técnicas, pois dispensa o uso de equipamentos sofisticados como ultra-centrífugas à vácuo. Também, permite prever com segurança a qualidade do *status* sanitário dos animais destinados à reprodução e comercialização, podendo detectar um maior número de animais infectados pelo CAEV se comparados com outros testes de rotina, tais como o IDGA, podendo facilitar a certificação dos rebanhos como verdadeiramente livres da doença.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos gerais

Desenvolver e padronizar um método rápido, prático e seguro para produção de antígenos do vírus da artrite encefalite caprina, pela separação da porção proteica p28 por microfiltração que possibilite o diagnóstico da CAE.

5.2 Objetivos específicos

- Produzir antígeno através da inoculação de um isolado do CAEV padrão cepa CAEV-CORK em cultura de fibroblastos de membrana sinovial caprina.
- Semi-purificar o vírus por meio de centrifugação e microfiltração.
- Padronizar as concentrações de antígeno a ser utilizada no ELISA indireto, assim como as diluições do soro e conjugado.
- Estabelecer um ponto de corte e testar a sensibilidade e especificidade do antígeno em animais cuja a sorologia já foi comprovada por outros métodos.

CAPITULO I: Produção de antígeno e separação da proteína p28 através de microfiltração seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina por ensaio imunoenzimático.

Luís Antonio de Oliveira Alves ¹, Maria Fátima da Silva Teixeira ¹, Alice Andrioli Pinheiro ², Raymundo Rizaldo Pinheiro ², Ronaldo Pereira Dias ¹, Carlos Alberto Furtado Lopes Júnior ¹, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior ¹, Dalva Alana Aragão de Azevedo³ Roberta Lomonte Lemos de Brito ⁴.

¹ Laboratório de Virologia – Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará , Fortaleza, Brasil. Endereço: Av. Paranjana, 1700, Cep: 60740-903. Telefone: +558586811231; Fax: +558531019849; e-mail: labovirfavetuece@uece.br

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária , Embrapa Caprinos e Ovinos.

³ Curso de Biologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, Sobral, Brasil.

⁴ Faculdade de Agricultura e Ciências Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – UNESP, São Paulo, Brasil.

Resumo:

O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um lentivírus que causa uma enfermidade crônica que não possui tratamento ou vacinação como ferramenta de controle, sendo responsável por perdas econômicas significativas em todo mundo. O diagnóstico é principalmente baseado em exames sorológicos, onde os antígenos utilizados para o diagnóstico são compostos basicamente pelas proteínas estruturais p28 e gp135. Este estudo teve como objetivo produzir um antígeno (Ag) a partir de cultura de células de Membrana Sinovial Caprina (MSC) infectadas com CAEV, pela técnica de microfiltração seriada, substituindo a ultracentrifugação em colchão de sacarose (Ag UCCS) para utilização em um ELISA indireto (ELISA-i). Amostras de 188 soros caprinos, que previamente foram testados pelo Western Blot (WB) com Ag UCCS, foram submetidos à análise pelo ELISA-i com o novo antígeno produzido, que mostrou uma concordância de 92% em relação ao antígeno UCCS. A

sensibilidade e especificidade do ELISA em relação ao WB foram de 95,65% e 88,5% respectivamente. A nova técnica criada a partir de microfiltrações, mostrou-se efetiva para o diagnóstico sorológico de anticorpos para CAEV em comparação ao antígeno ultracentrifugado, apresentando-se, portanto, como uma alternativa viável para produção de antígeno purificado de lentivírus de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: CAEV; ELISA; Lentivírus de Pequenos Ruminantes; Western Blot.

Abstract

The caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is a lentivirus which causes a chronic character disease that does not have treatment or vaccination as a control tool, being responsible for significant economical losses all over the world. The diagnosis is mainly based on serological exams, in which the antigens (Ag) used for diagnosis are basically composed by p28 and gp135 structural proteins. This study aimed to produce an antigen (Ag) from the culture of goat synovial membrane cells (MSC) infected by CAEV by serial microfiltering technique replacing ultracentrifugation in saccharose Mattress (UCCS) for the indirect diagnosis ELISA tests (i-ELISA). Samples of 188 serum from goats, previously examined by Western Blot (WB) with Ag UCCS were submitted to analysis by i-ELISA with new antigen produced, demonstrating an accordance of 92% in relation to UCCS antigen. The specificity and sensitivity relating to WB were of 95.65% and 88.5% respectively. The new technique created from the microfiltering showed itself effective to the serological antibodies diagnosis of CAEV comparing to the ultracentrifuged one, presenting itself, therefore, as to viable alternative for purified antigen of lentivirus of small ruminants.

Keywords: CAEV; ELISA; Small Ruminant Lentivirus; Western blot.

1. Introdução

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade multissistêmica, de caráter crônico e debilitante, causado por um RNA vírus que pertence ao gênero *Lentivirus* da família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae (ICTV, 2009). Apresenta como principais formas clínicas: artrite, pneumonia e mastite, observadas em animais adultos e mais raramente a leucoencefalomielite em caprinos jovens (Pugh, 2004), e não possuem tratamento ou vacinação como ferramenta de controle. (Peterhans, 2004; Konishi, et al., 2011).

Os lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) caracterizam-se por realizar replicação em células do sistema monócito-fagocitário, perdurando no interior dos monócitos e macrófagos por um intervalo de tempo prolongado, do momento da infecção até o aparecimento de sintomas. Devido a esse fato, o diagnóstico baseado no exame clínico é limitado, sendo necessária a detecção de anticorpos específicos por testes sorológicos (Pasick, 1998).

Dentre os testes disponíveis, a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) é o mais utilizado para o diagnóstico de infecção por lentivírus (Houwers et al., 1988; Knowles et al., 1990). Este, no entanto, é uma técnica de baixa sensibilidade em níveis reduzidos de anticorpos (Kwang et al., 1993; Keen et al., 1995; MC Connell et al., 1998).

Alternativamente, tem-se utilizado o Ensaio Imunoenzimático indireto por ser mais sensível do que o IDGA, porém este apresenta outras desvantagens, como custo de produção e a necessidade da utilização de antígenos mais purificados do que os empregados no IDGA (Akerstrom et al., 1985; Pinheiro et al., 2010).

Na purificação de antígenos para padronização do teste ELISA-i, muitos protocolos são utilizados. Estes empregam, de forma simples ou combinada, as seguintes técnicas: centrifugação simples, centrifugação e ultracentrifugação em gradiente contínuo ou descontínuo de sacarose, filtração pressurizada, cromatografias de troca-iônica e de afinidade, concentração e precipitação com polietilenoglicol 8.000 (PEG 8.000) (Houwers et al., 1982; Archambault et al., 1988;

Simard e Briscoe, 1990a; Simard e Briscoe, 1990b; Zanoni et al., 1994; Simard et al., 2001). Contudo, a maioria destes protocolos são demorados e onerosos, já que possuem várias etapas de processamento e requerem uma construção laboratorial sofisticada.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e padronização de um método rápido, prático e menos oneroso para produção de antígenos do vírus da Artrite Encefalite Caprina, pela separação da porção protéica p28, através de microfiltragens seriadas que possibilite o diagnóstico por imunoenaios, bem como comparar com antígenos produzidos por ultracentrifugação em colchão de sacarose.

O uso dessa técnica mais prática de diagnóstico para detecção dos lentivírus pode auxiliar na definição do *status* do rebanho para a implementação de medidas de controle mais eficientes, com monitoramento periódico dos animais, prevenindo a disseminação dessa enfermidade nos rebanhos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cultivo celular e produção de antígeno

Para a produção do antígeno, foram utilizados sobrenadantes de cultivo de células de MSC oriundas de articulações cárpicas, conforme definidos por Crawford et al., (1980), de animal comprovadamente livre de CAEV pelos testes de IDGA, Western Blot e PCR, seguindo as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará – CEUA/UECE, de acordo com o protocolo de N°11224611-7/53.

Essas células foram inoculadas com cepa padrão CAEV-Cork de título inicial $10^{5,3}$ TCID₅₀/mL (Tissue Culture Infectious Dose 50%), as quais apresentaram um efeito citopático caracterizado por sincícios e lise celular, conforme os apontamentos de Pinheiro (2010). Os sobrenadantes foram então congelados a -80°C e descongelados a 37°C por três ciclos consecutivos e clarificados por centrifugação a 3.300 xg a 4°C por uma hora e armazenados a -20°C até o momento da purificação.

2.2 Purificação por microfiltração seriada

Após a clarificação, 1.890 mL de sobrenadante foi submetido à microfiltrações seriadas com uso de membranas de 100, 50 e 10 kilodantons (kDa), respectivamente, usando o sistema AMICON modelo 8400 (Millipore® Bedford, MA) com pressão positiva de gás nitrogênio, de acordo com as recomendações do fabricante. Todo o processo foi realizado sob refrigeração, com a finalidade de evitar a desnaturação das proteínas do antígeno (WRIGHT et al., 1993).

Na primeira etapa do processo, solutos acima de 100 kDa foram retidos na câmara. Já a porção abaixo do “cut-off” da membrana que saiu no filtrado foi aproveitada para a próxima etapa de filtração, utilizando a membrana seletiva ao peso molecular de 50kDa, que seguiu o mesmo protocolo. Por fim, um total de 50 mL do concentrado retido na câmara, relativo às porções entre 10 kDa e 50 kDa que correspondem a faixa de peso molecular da proteína alvo p28 de 28 kDa, foi posteriormente liofilizado até que atingisse uma concentração 2200 vezes em relação ao volume original.

2.3 Dosagem de proteína total, SDS-PAGE e Western Blot (WB)

A concentração protéica total foi determinada por ensaio colorimétrico, conforme Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Em seguida, o antígeno purificado, amostras de antígeno ultra centrifugado em colchão de sacarose e o padrão broad-range (14,4 a 97 kDa - LMW Electrophoresis da Pharmacia Biotech®) foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970), com géis de concentração e separação a 4% e 12,5% respectivamente. Um dos géis resultantes do processo de eletroforese foi corado usando azul de Comassie, segundo Harlon e Lane (1998), para visualização das bandas. Os outros foram submetidos à transferência passiva, onde o gel é colocado entre duas folhas de nitrocelulose (Dura-blot™ 0,45µm - SIGMA) e três folhas de papel de filtro, montadas como sanduíche entre duas lâminas de vidro

empacotadas com filme plástico e papel alumínio, em tampão de transferência, sob pressão de 12kg, por três dias, em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, todo o aparato foi desmontado e as membranas foram coradas com corante de Ponceau's, para verificar a transferência das proteínas para a membrana (Tesoro-Cruz et al., 2009).

As membranas foram bloqueadas com solução PBS Tween 0,3%, durante 60 minutos e lavadas com solução PBS Tween 0,05% por 5 minutos em três ciclos. O soro positivo do kit comercial Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. (Veterinary Diagnostic Technology, Inc[®], USA) foi diluído na concentração de (1:100) e adicionado às membranas, sendo incubado por 90 minutos a 37° C, sob constante agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas novamente, como supracitado, para adição do conjugado Anti-Sheep IgG Peroxidase produzido em burro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na diluição (1:1500) em PBS incubando por 60 minutos. Após as membranas foram novamente lavadas com solução PBS Tween 0,05% e PBS, respectivamente, por duas vezes durante cinco minutos. A reação de cor foi realizada segundo Tesoro-Cruz et al., (2003), ao abrigo da luz com adição do substrato DAB/4-Cloronaphthol e Peróxido de Hidrogênio a 30%, parando a reação com água destilada.

2.4 Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

A microtécnica de IDGA foi realizada como descrita por Gouveia (1994), com o uso do kit experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos, para a averiguação de formação de linhas de precipitação frente à proteína do capsídeo p28 contida no antígeno produzido. A leitura presuntiva foi feita após 48 horas, com posterior leitura confirmativa passadas 72 horas (CUTLIP et al., 1977).

2.5 Padronização de um Elisa indireto (Elisa-i)

Para determinação das diluições de uso, placas de poliestireno de 96 poços (NUNC-MAXISORP™) foram sensibilizadas por 1 h a 37°C e incubadas a 8°C *overnight* com diluições seriadas de 20 a 0,125µg/mL de proteína viral em tampão carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 1,7g/L, NaHCO_3 2,86g/L, pH 9,6 0,05M), para determinação da concentração ótima do antígeno obtido.

No dia seguinte, as placas foram lavadas com solução PBS-Tween 0,05% duas vezes e incubadas novamente com solução de bloqueio (caseína 2% em PBS) por 90 minutos a 37°C, para que ocorresse o bloqueio dos sítios reativos. Passado esse período, a placa foi novamente lavada com solução PBS-Tween 0,05% duas vezes, adicionando, em seguida, os soros (Positivo, Reagente e Negativo) em diluições variando de 1:50 a 1:100 do kit de IDGA (Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA) e incubados por mais 60 min a 37°C, a fim de definir a melhor diluição das amostras.

Continuamente, os poços foram lavados, desta vez por cinco vezes, e incubados com conjugado DONKEY (Anti-Sheep IgG Peroxidase - SIGMA) nas diluições de 1:1000 e 1:1500 por mais 1h a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas, como supracitado, por cinco vezes e reveladas em câmara escura por 18 minutos com substrato OPD (2 mg de O-phenylenediamine em presença de 4µL de H_2O_2) e com 10 mL de tampão citrato, seguida de adição do ácido sulfúrico (H_2SO_4 4N) como inibidor da reação, e leitura a 490 nm em espectrofotômetro (WRIGHT et al., 1993).

A melhor diluição escolhida foi a que apresentou uma maior diferença nas leituras óticas entre soro positivo e negativo. A padronização do teste seguiu as recomendações da FAO/OIE, com soros em duplicata e resultados expressos em densidade óptica (DO) e percentual de positividade (razão entre DO da amostra e controle positivo) (Motha; Ralston,1994).

2.6 Amostras e ponto de corte

Um total de 119 animais comprovadamente negativos pelos testes de IDGA, ELISA e WB com Ag UCCS, provenientes do programa de controle da CAE da Embrapa Caprinos e Ovinos, foram utilizados para a determinação do ponto de corte do teste ELISA. Este corresponde a média do percentual de positividade dos animais negativos somado a três desvios padrões ($3SD+X$). Da mesma forma, um valor absoluto de 188 soros de animais positivos e negativos, comprovados pela técnica de WB com antígeno UCCS, foram comparados pelos testes do Qui-Quarado (χ^2) (Tyler ; Cullor, 1989), com uso do software EpiInfo 2000 e Excel a fim de comparar a sensibilidade e especificidade relativas do Ag UCCS em relação ao Ag microfiltrado (AgMi), assim como o índice de concordância e índice Kappa entre os dois resultados (Caquineau et al., 1988).

3. Resultados

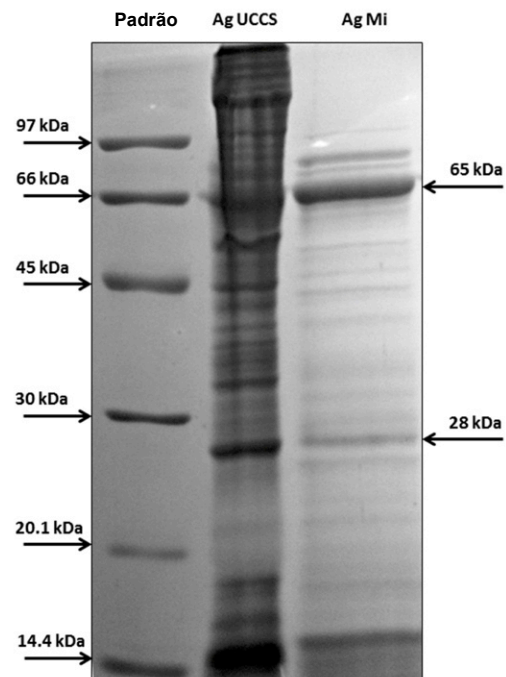
3.1 Purificação, concentração e dosagem de proteínas.

A concentração do antígeno, após a microfiltração seriada e subsequente liofilização, resultou em um volume final de 800 μ L, correspondendo, aproximadamente, a um volume 2.362 vezes maior que a quantidade inicial. No tocante à dosagem de proteínas totais pelo método de Bradford, o antígeno purificado AgMi mostrou uma concentração de 30,87 μ g/ μ L.

3.2 SDS-PAGE e Western Blot

O padrão eletroforético apresentado pelas proteínas do AgMi, mostra um modelo de bandas com pesos moleculares aproximados de 14,4 a 97 kDa, como pode ser representado na Fig., 1.

Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Comparação entre antígeno Ultracentrifugado (UCCS) e Antígeno Microfiltrado (AgMi).



O antígeno AgMi com 30,87 μ g/ μ L foi diluído para uma concentração final de 20 μ g/poço, para melhor visualização das bandas. Para o Ag UCCS também foi utilizado essa mesma concentração.

Dentre as proteínas observadas, destacou-se a banda protéica com peso molecular de 28 kDa que demonstrou capacidade antigênica no teste de Western Blot, como mostra a Fig., 2. A porção referente à 135 kDa testada com uso de soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp135 foi fracamente observada.

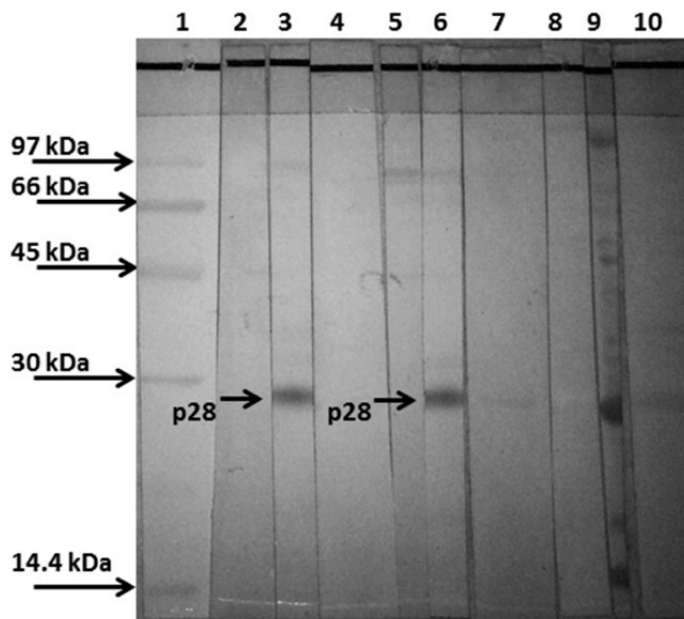


Figura 2: Western Blot de antígenos CAEV Microfiltrado – AgMi (Colunas 2 a 7) e Ultracentrifugado - UCCS (Colunas 8 a 10). Coluna 1 (Padrão de proteína); Colunas 2, 5 e 8 (soro caprino negativo); Colunas 4, 7 e 10 (soro reagente); Colunas 3,6 e 9 (soro positivo).

O teste de WB utilizando AgMi, demonstrou que alguns animais apresentaram anticorpos para a porção referente à proteína p28, mostrando a positividade para a CAE, sendo que esses animais foram testados com a mesma técnica utilizando outro antígeno de procedência mais onerosa e laboriosa (Ag UCCS) tendo resultado semelhante.

3.3 Ensaio Imunoenzimático

A concentração ótima de AgMi, padronizada pela obtenção da maior diferença entre as densidades ópticas (DO) dos soros positivos e negativos, foi de 1 µg/poço com diluição do soro de 1:100 e conjugado 1:1500. O ponto de corte realizado a partir da análise sorológica de 119 animais comprovadamente negativos foi de 0,352. Desta forma, o teste ELISA indireto realizado a partir de AgMi foi capaz de detectar um número de 88 animais positivos num total de 99, e 85 animais negativos de um total de 89 previamente negativados por WB (AgUCCS), mostrando

uma sensibilidade de 95,6% e especificidade de 88,5%, respectivamente, assim como valor preditivo positivo de 88,9% e valor preditivo negativo de 96,5%, com índice Kappa de 0,841, o que demonstrou uma boa concordância entre os testes. Os dados mostraram-se significativos para o Qui-Quadrado ($p < 0,001$). A comparação entre o resultado dos testes WB (AgUCCS) e ELISA AgMi são mostrados na Tab., 1.

Tabela 1: Comparação dos resultados entre as técnicas de Western Blot (AgUCCS) e ELISA (AgMi)

		ELISA		
		Positivo	Negativo	Total
WESTERN BLOT	Positivo	88	11	99
	Negativo	4	85	89
Total				188

Animais positivos no teste ELISA e WB (n=88); Negativos ELISA e WB (n=85); Positivos para ELISA e Negativos WB (n=4); Negativos para ELISA e positivos WB (n=11). Qui-quadrado entre os testes: 130,23.

4. Discussão

Um ponto crucial no desenvolvimento de um teste sorológico mais sensível é o processo de purificação do antígeno empregado (Celer; Celer, 2001). Devido à fase precoce da infecção, vários animais infectados, mesmo visivelmente saudáveis, são soronegativos por períodos bastante variados, podendo mostrar uma soroconversão tardia, inexistência ou produção de anticorpos não detectáveis (Adams, 1982; Rimstad et al., 1993; Brodie et al., 1998; Tizard, 1998).

O teste de referência largamente utilizado ainda é o IDGA, embora este seja de baixa sensibilidade (Knowles et. al., 1994). Outras técnicas, como ELISA e WB, tornam-se bastante onerosas, principalmente para o pequeno produtor, por se tratar de testes que necessitam de kits importados ou fabricação de antígenos que precisam de uma moderna estrutura laboratorial (Oliveira, 2007).

Western Blot ou immunoblot é um teste mais sensível que ELISA, porém possui como desvantagem o fato de ser uma técnica laboriosa e demorada, que necessita a separação das proteínas por eletroforese antes que ocorra à transferência das mesmas para a membrana de nitrocelulose (Pinheiro, 2001) e como vantagem a menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos e é classificado como o teste complementar, sendo o *gold test* na validação de outros (Zanoni et al., 1989).

Este trabalho descreve um método simples, prático e menos oneroso para produção de um antígeno AgMi de alta qualidade para ensaios imunoenzimáticos, quando comparado com Ag UCCS. Este antígeno associado à técnica ELISA-i, alia as vantagens do Ag com a simplicidade do método sorológico, usado no diagnóstico da CAE, pois não exige uso de equipamentos sofisticados, assim como proporciona um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) com boa sensibilidade e especificidade nos resultados obtidos.

O teste de WB, feito com uso do antígeno produzido neste experimento AgMi, mostrou-se capaz de positivar animais na banda referente à proteína p28, que é identificado como sendo a proteína interna do capsídeo mais abundante e que estimula uma forte resposta humoral durante a infecção (Joag et al., 1996). Esta mesma porção referente à proteína de peso molecular 28 kDa, também demonstrou reação positiva (reação de cor) com o uso de outro antígeno, de procedência mais onerosa e laboriosa (AgUCCS). Entretanto, o teste de WB (AgUCCS), embora seja mais dispendioso, mostrou-se mais sensível e específico quando comparado ao ELISA-i AgMi, confirmando os resultados de Pinheiro (2001), que também afirma ser ideal, em estudos de prevalência, dispor de duas técnicas como critério

independente e seguro para classificar uma população, fato também observado por Celler et al., (1998).

Vale salientar ainda que o antígeno AgMi utilizado não recebeu nenhum tipo de tratamento especial, sendo constituído apenas de um concentrado de proteínas virais obtido de cultivo celular primário, conferindo a este menor custo e fácil estocagem, o que difere dos protocolos convencionais, como o utilizado por Schroeder et al., (1985).

5. Conclusão

O teste realizado com antígeno produzido por microfiltração seriada para separação da proteína p28 mostrou-se de alta sensibilidade e boa especificidade, podendo ser comparado a outros kits disponíveis no mercado. Deste modo, pode ser utilizado como teste de diagnóstico seguro para CAE, por apresentar um índice de concordância de 92% em relação ao teste de Western Blot, que utiliza antígeno produzido através de técnicas de ultracentrifugação em colchão de sacarose, técnica mais largamente utilizada para certificação de alguns casos duvidosos.

6. Agradecimentos

Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará – UECE, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, que financiou este trabalho.

7. Referências

ADAMS, D. S. The meaning of the agar gel immunodiffusion test (IDGA) for antibody against caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). Dairy Goat Journal. v. 60: p. 17-20 p. 1982.

AKERSTROM, B. et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. J Immunol, v. 135, n. 4, p. 2589-92, 1985.

ARCHAMBAULT, D. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. J Clin Microbiol, v. 26, n. 5, p. 971-5, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: (Ed.). Anal Biochem. United States, v.72, 1976. p.248-54.

BRODIE, S. J. et al. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: A review. Small Ruminant Research, v. 27, n. 1, p. 1-17, 1998.

CAQUINEAU, L.; DOUART, A.; LECOANET, J. Mice au point d'une méthode immunoenzymatique E.L.I.S.A. pour la détection des anticorps anti virus B.V.D. dans le serum des bovines. Recueil de Médecine Vétérinaire 164: 381-386 p. 1988.

CELER, V. J.; CELER, V. Detection of antibodies to ovine lentivirus using recombinant capsid and transmembrane proteins. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health v. 48, p. 89-95, 2001.

CELER, V., JR. et al. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and IDGA test. Zentralbl Veterinarmed B, v. 45, n. 3, p. 183-8, 1998.

CRAWFORD, T. B. et al. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v. 207, n. 4434, p. 997-9, 1980.

CUTLIP, R. C.; JACKSON, T. A.; LAIRD, G. A. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res*, v. 38, n. 7, p. 1081-4, 1977.

GOUVEIA, A. M. Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus Pneumonia Progressiva Ovina (OPP) - Maedi-Visna (MVV) - Artrite Encefalite Caprina (CAEV). Sobral: EMBRAPA Caprinos, 1994. 4p.

HARLON, E.; LANE, D. *Antibodies: a laboratory manual*. 4. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. 726 ISBN 978-087969314-5

HOUWERS, D. J. et al. Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of sheep infected with maedi-visna virus. *Vet Rec*, v. 122, n. 18, p. 435-7, 30 1988.

HOUWERS, D. J.; GIELKENS, A. L.; SCHAAKE, J., JR. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet Microbiol*, v. 7, n. 3, p. 209-19, 1982.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB//00.061.1.06.007.htm>. Acesso em 25 de maio de 2011.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviruses. In: D.M., K. e P.M., H. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1977-1996.

KEEN, J.; KWANG, J.; ROSATI, S. Comparison of ovine lentivirus detection by conventional and recombinant serological methods. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 47, n. 3-4, p. 295-309, 1995.

KNOWLES, D. P., JR. et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J Clin Microbiol*, v. 32, n. 1, p. 243-5, 1994.

KNOWLES, D., JR. et al. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J Virol*, v. 64, n. 5, p. 2396-8, 1990.

KONISHI, M. et al. Combined eradication strategy for CAE in a dairy goat farm in Japan. *Small Ruminant Research*, 2011, Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TC5-52NC4V5-1/2/3bac38f6557b66c5a65d3ce5b2dde83b>>. Acesso em 14 julho de 2011.

KWANG, J. et al. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. *J Vet Diagn Invest*, v. 5, n. 2, p. 189-93, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

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, n. 16, p. 431-3, 1998.

MOTHA, M. X.; RALSTON, J. C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet Microbiol*, v. 38, n. 4, p. 359-67, 1994.

OLIVEIRA, M. M. M. Diagnóstico e Controle de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em Caprinos. 2007. 114 (Tese de Doutorado). Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE.

PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res*, v. 62, n. 4, p. 241-4, 1998.

PETERHANS, E. et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. In: (Ed.). *Vet Res. France: 2004 INRA, EDP Sciences*, v.35, 2004. p.257-74. ISBN 0928-4249

PINHEIRO, R. R. et al. avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arq. Inst. Biol* 77: 133-137 p. 2010.

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

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

RIMSTAD, E. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res*, v. 54, n. 11, p. 1858-62, 1993.

SCHROEDER, B. A.; OLIVER, R. E.; CATHCART, A. The development and evaluation of an ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat sera. *N Z Vet J*, v. 33, n. 12, p. 213-5, 1985.

SIMARD, C. et al. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 8, n. 2, p. 352-6, 2001.

SIMARD, C. L.; BRISCOE, M. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. I. A simple technique for production of antigen using sodium dodecyl sulfate treatment. *Can J Vet Res*, v. 54, n. 4, p. 446-50, 1990a.

SIMARD, C. L.; BRISCOE, M. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can J Vet Res*, v. 54, n. 4, p. 451-6, 1990b.

TESORO-CRUZ, E. et al. Cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis virus and type 1 human immunodeficiency virus. In: (Ed.). *Arch Med Res. United States*, v.34, 2003. p.362-6.

TESORO-CRUZ, E. et al. Frequency of the serological reactivity against the caprine arthritis encephalitis lentivirus gp135 in children who consume goat milk. In: (Ed.). *Arch Med Res. United States*, v.40, 2009. p.204-7.

TIZARD, I. R. *Introdução à Imunologia veterinária*. 2. São Paulo: Roca, 1998. ISBN 978-85-352-3087-1.

TYLER, J. W.; CULLOR, J. S. Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J Am Vet Med Assoc*, v. 194, n. 11, p. 1550-8, 1989.

WRIGHT, P. F. et al. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech*, v. 12, n. 2, p. 435-50, 1993.

ZANONI, R. G. et al. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Zentralbl Veterinarmed B*, v. 41, n. 10, p. 662-9, 1994.

ZANONI, R.; KRIEG, 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, n. 3, p. 580-2, 1989.

6. CONCLUSÕES

- O antígeno produzido por microfiltração seriada com uso do sistema de filtração AMICON, para separação da porção referente à proteína p28 do capsídeo, que foi utilizado em testes Elisa indireto, mostrou-se de alta sensibilidade e boa especificidade, podendo ser comparado com outros kits de diagnóstico ELISA-i disponíveis para comercialização nacional e internacional.
- O teste pode ser uma alternativa viável, pela facilidade de execução, eficiência e pouco custo e pode ser empregado como teste de diagnóstico seguro para CAE
- Também apresentou um número de concordância de 92% se comparado com um teste Western Blot, que utiliza antígeno produzido através da ultracentrifugação em colchão de sacarose, técnica mais largamente utilizada para certificação de alguns casos duvidosos.

7. PERSPECTIVAS

Nenhum tratamento está disponível atualmente contra o CAEV. A vacinação experimental não tem produzido resultados positivos. Assim, abordagens alternativas para o controle da infecção por CAEV têm sido desenvolvidas com alta qualidade como ferramentas de diagnóstico. Os métodos biomoleculares de diagnóstico podem detectar uma ampla gama de cepas virais, mas uma combinação de métodos, IDGA, ELISA, Western Blot e PCR, pode ser necessária para melhorar o diagnóstico de forma significativa.

Analisando a realidade econômica do Nordeste brasileiro e a inófia sempre presente em minimizar os gastos referentes à produção de antígenos que não necessitem de aporte laboratorial, comparado a outros métodos disponíveis, este trabalho pode facilitar futuramente a esclarecer resultados sorológicos de forma mais barata do que a convencional, fomentando a implantação deste como teste de escolha por órgãos oficiais para ser realizado rotineiramente, tudo isto incorporado a uma conscientização dos criadores sobre os danos causados por esta enfermidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S. The meaning of the agar gel immunodiffusion test (AGID) for antibody against caprine arthritis encephalitis virus (CAEV). **Dairy Goat Journal**. 60: 17-20 p. 1982.

AKERSTROM, B. et al. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **J Immunol**, v. 135, n. 4, p. 2589-92, 1985.

ALI AL AHMAD, M. Z. et al. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. In: (Ed.). **Theriogenology**. United States, v.64, 2005. p.1656-66. ISBN 0093-691X

ANDRIOLI, A. et al. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, 2006.

ARCHAMBAULT, D. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 5, p. 971-5, 1988.

ASTUDILLO, V. M.; KANTOR, I. N. El problema de la validez de una prueba diagnóstica para uso masivo como procedimiento estadístico de clasificación. **Bol. Centro Panamericano Fiebre Aftosa**, v. 43-44, p. 37-43, 1981.

BARLOUGH, J. et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **J Virol Methods**, v. 50, n. 1-3, p. 101-13, 1994.

BELKNAP, E. B. Enfermidades do sistema respiratório. In: PUGH, D. G. (Ed.). **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. p.132-134.

BJERRUM, O. J.; HEEGAARD, N. H. H. **Handbook of Immunoblotting of Proteins: technical descriptions**. Florida: CRC Press, 1988. 265

BLACKLAWS, B. A. et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. In: (Ed.). **Vet Microbiol**. Netherlands, v.101, 2004. p.199-208. ISBN 0378-1135.

BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M. **Doenças causadas por vírus e clamídias**. 7. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 758

BOHLAND, E.; D'ANGELINO, J. L. Artrite encefalite caprina: avaliação dos aspectos produtivos e reprodutivos de animais infectados e não infectados. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 42, n. 2, 2005.

BRINKHOF, J.; VAN MAANEN, C. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. In: (Ed.). **Clin Vaccine Immunol**. United States, v.14, 2007. p.1210-4. ISBN 1556-6811.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 85 (Dissertação de Mestrado). Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral-Ceará.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S. D.; TEIXEIRA, M. F. D. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.

CARNEIRO; DIAS, F. F. **Perdas econômicas decorrentes da artrite-encefalite caprina em rebanho leiteiro**. 2011. 97 (Dissertação de Mestrado). Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral-Ceará.

CARROZZA, M. L. et al. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. In: (Ed.). **J Virol Methods**. Netherlands, v.107, 2003. p.121-7. ISBN 0166-0934.

CASTRO, R. S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. 1998. 132 (Tese de Doutorado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas, Minas Gerais.

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. 59 Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú.

CELER, V. J.; CELER, V. Detection of antibodies to ovine lentivirus using recombinant capsid and transmembrane proteins. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health** v. 48, p. 89-95, 2001.

CHEBLOUNE, Y. et al. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. **Virology**, United States, v. 222, n. 1, p. 21-30, 1996.

COFFIN, J. M. Retroviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M., et al (Ed.). **Fields Virology**. 3. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p.1767-1847.

CRAWFORD, T. B. et al. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v. 207, n. 4434, p. 997-9, 1980.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **J Am Vet Med Assoc**, v. 178, n. 7, p. 713-9, 1981.

CRUZ, B. R. 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 (CAEV). **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.** v. 7, n. 3, p. 355-364, 2009.

CUTLIP, R. C. et al. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 237-250, 1988.

DE ANDRES, D. et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Vet Microbiol**, Netherlands, v. 107, n. 1-2, p. 49-62, 2005.

EXTRAMIANA, A. B. et al. Evaluation of a PCR technique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. v. 44, n.2, p.109-118, 2002.

FEITOSA, A. L. V. L. **Análise filogenética de lentivírus de pequenos ruminantes isolados do Ceará**. 2007. 84 (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza - Ceará.

FIENI, F. et al. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 931-40, 2002.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 1. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. 888

FROTA, M. N. L. et al. Artrite encefalite caprina em cabritos de rebanhos com programa de controle no estado do Ceará. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 72, n. 2, p. 147,152, 2005.

GONZALEZ, B. et al. Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. **Vaccine**, Netherlands, v. 23, n. 34, p. 4342-52, 2005.

GORRELL, M. D. et al. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. **J Virol**, v. 66, n. 5, p. 2679-88, 1992.

GREGORY, L. et al. Detecção do vírus da Artrite-Encefalite Caprina em amostras de leite de cabras pela reação em cadeia da polimerase (pcr) e nested-pcr. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 142-146, 2009.

HABERT, A. C. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006. ISBN 857650085X 9788576500858.

HOUWERS, D. J. et al. Incidence of indurative lymphocytic mastitis in a flock of sheep infected with maedi-visna virus. *Vet Rec*, v. 122, n. 18, p. 435-7, 30 1988.

HOUWERS, D. J.; GIELKENS, A. L.; SCHAAKE, J., JR. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. **Vet Microbiol**, v. 7, n. 3, p. 209-19, 1982.

HUSO, D.L. NARAYAN, O. HART, G. W. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **J Virol**, v. 62, n. 6, p. 1974-80, Jun 1988.

IBGE (2009). **Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=73&z=t&o=22&i=P>>. Acesso em: 14 Set. 2011.

KEEN, J.; KWANG, J.; ROSATI, S. Comparison of ovine lentivirus detection by conventional and recombinant serological methods. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 47, n. 3-4, p. 295-309, 1995.

KNOWLES, D. P., JR. Laboratory diagnostic tests for retrovirus infections of small ruminants. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 1997.

KNOWLES, D., JR. et al. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **J Virol**, v. 64, n. 5, p. 2396-8, 1990.

KWANG, J. et al. Evaluation of an ELISA for detection of ovine progressive pneumonia antibodies using a recombinant transmembrane envelope protein. **J Vet Diagn Invest**, v. 5, n. 2, p. 189-93, 1993.

LAKSHMINARAYANAI AH, N. **Equations of membrane biophysics**. Orlando: Academic Press, 1984. 2591 ISBN 0124342604 9780124342606.

LEROUX, C. et al. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. **J Gen Virol**, v. 76 (Pt 6), p. 1533-7, 1995.

LUJÁN, L. et al. Seroprevalence of maedi-visna infection in sheep in the north-east of Spain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 15, n. 2-3, p. 181-190, 1993.

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, n. 16, p. 431-3, 1998.

MCGRATH, M. et al. Retrovirus purification: method that conserves envelope glycoprotein and maximizes infectivity. **J Virol**, v. 25, n. 3, p. 923-7, 1978.

MERCOSUL. Requisitos zoonosológicos dos estados partes para a importação de caprinos para reprodução ou engorda (revogação da res. gmc nº 42/02). Disponível em: <<http://www.mercosul.gov.br/normativa/resolucao/2009/mercosul-gmc-res-no-06-09/mercosul-gmc-res-no-06-09/?searchterm=CAE>>. Acesso em 26 Agosto de 2011.

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. **Rev Infect Dis**, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.

NOBLE, R. D.; STERN, S. A.; SCIENCE DIRECT. **Membrane separations technology principles and applications**. Amsterdam; New York: Elsevier, 1995. 717 ISBN 9780444816337

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

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of standards diagnostic tests and vaccines. World Organization for Animal Health, Paris: OIE, 2004. p.1178, 5.ed.

OIE. **Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestre**, 2006. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 12 Agosto, 2011.

OLIVEIRA, M. M. M. **Diagnóstico e Controle de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em Caprinos**. 2007. 114 (Doutor). Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE.

PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Can J Vet Res*, v. 62, n. 4, p. 241-4, 1998.

PAULA, N. R. D. O. et al. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. v. 85, n. 1, p. 27-33, 2009.

PAULSON, D. J.; WILSON, R. L.; SPATZ, D. **Crossflow Membrane Technology and its Applications. Food Technology**, v. 38, n. 12, p. 77-111, 1984.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: 2004. 444p.

PETERHANS, E. et al. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. In: (Ed.). **Vet Res**. France: 2004 INRA, EDP Sciences, v.35, 2004. p.257-74.

PINHEIRO, R. R. et al. avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arq. Inst. Biol** 77: 133-137 p. 2010.

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

PISONI, G. et al. Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: comparative analysis and molecular epidemiological applications. **Virus Res. Netherlands**. 116: 159-67 p. 2006.

PLAZA, M. et al. Caprine arthritis encephalitis virus diagnosed by ELISA in lactating goats using milk samples. **Small Ruminant Research**, v. 81, n. 2-3, p. 189-192, 2009.

QUINN, P. J.; WEISS, L. H. N.; WEISS, R. D. N. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. São Paulo: Artmed, 2005. ISBN 8536304863 9788536304861.

REDDY, P. G.; SAPP, W. J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 11, p. 3042-3, 1993.

REINA, R. et al. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. **Vet J. England**. 182: p. 31-7 2009.

REINA, R. et al. Use of small ruminant lentivirus-infected rams for artificial insemination. **Vet J, England**, v. 189, n. 1, p. 106-7, 2011.

RIMSTAD, E. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **Am J Vet Res**, v. 54, n. 11, p. 1858-62, 1993.

ROWE, J. D. et al. Risk factors associated with caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairies. **Am J Vet Res**, v. 52, n. 3, p. 510-4, 1991.

ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v. 13, n. 1, p. 35-53, 1997.

RUSSO, P. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. **Vet Rec**, v. 140, n. 18, p. 483-4, 1997.

SHAH, C. et al. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. **J Virol**, United States, v. 78, n. 14, p. 7518-22, 2004.

SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonie of sheep: an epizootiological and pathological study. **Br. Vet. J.**, v. 110, p. 225-270, 1954.

SILVA, J. B. A. **Levantamento sorológico pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) da lentivirose ovina em rebanhos do Rio Grande do Norte, Brasil.** 2003. 58 (Dissertação de Mestrado). Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-Ceará.

SILVA, J. B. A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos préantrais de cabras naturalmente infectadas.** 2006. 148 (Tese de Doutorado). Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-Ceará.

SIMARD, C. et al. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 2, p. 352-6, 2001.

SIMARD, C. L.; BRISCOE, M. R. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. I. A simple technique for production of antigen using sodium dodecyl sulfate treatment. **Can J Vet Res**, v. 54, n. 4, p. 446-50, 1990a.

SIMARD, C. L.; BRISCOE, M. R.. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. **Can J Vet Res**, v. 54, n. 4, p. 451-6, 1990b.

SIMPLÍCIO, A. A caprino-ovinocultura na visão do agronegócio. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 24, p. 15-18, 2001.

STACHISSINI, A. V. M. et al. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. vol.44 número1; Resumo: S1413-95962007000100007. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, n. 1, 2007.

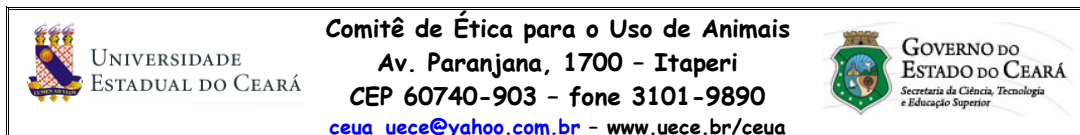
TIZARD, I. R.; OLIVEIRA, P. M. A. D. **Introdução à imunologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1998. ISBN 8572412425 9788572412421.

TOFT, N. et al. Evaluation of three serological tests for diagnosis of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. **Vet Microbiol**, Netherlands, v. 120, n. 1-2, p. 77-86, 2007.

ZANONI, R. G. et al. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 41, n. 10, p. 662-9, 1994.

ANEXOS

Anexo 1: Declaração do Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o **Projeto de Pesquisa** intitulado **“Produção de antígeno e separação da proteína p28 através de microfiltração seriada para o soro diagnóstico da AEC por ensaio imunoenzimático”** registrado sob o número **11224611-7/53**, tendo como pesquisador principal **Maria Fátima da Silva Teixeira** está de acordo com os **Princípios Éticos de Experimentação Animal** adotados pelo **Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará** sendo aprovado em 26 de setembro de 2011. Este certificado expira-se 26 de setembro de 2015.

Fortaleza, 26 de setembro de 2011



José Mário Girão Abreu
Presidente CEUA-UECE

Anexo 2: Declaração da EMBRAPA ao Comitê de Ética



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que os soros utilizados para os ensaios imunoenzimáticos – ELISA e Western Blotting da dissertação *PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E SEPARAÇÃO DA PROTEÍNA P28 ATRAVÉS DE MICROFILTRAGEM SERIADA PARA SORODIAGNÓSTICO DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA*, foram coletados para o programa de controle da CAE da Embrapa Caprinos e Ovinos, por venipuntura da jugular após rigorosa assepsia e de acordo com as resoluções do CONSEA.

Por ser expressão de inteira verdade,
Firmamos a presente.

Sobral, 20 de setembro de 2011.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Raymundo Rizaldo Pinheiro
Pesquisador A da Embrapa Caprinos e Ovinos
CRMV-CE 1106

Anexo 3: Comprovante de submissão de artigo

Recibo - FEP MVZ

07/12/11 21:11

**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: journal@vet.ufmg.br

Sr.(s): Luís Antonio de Oliveira Alves, Maria Fátima da Silva Teixeira, Alice Andrioli Pinheiro, Raymundo Rizaldo Pinheiro, Ronaldo Pereira Dias, Roberta Lomonte Lemos de Brito, Carlos Alberto Furtado Lopes Júnior, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior, Dalva Alana Aragão de Azevedo,

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

Produção de antígeno e separação da proteína p28 através de microfiltração seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina por ensaio imunoenzimático.

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.: 4916/2011

Recebido em: 04/08/2011

Atenciosamente,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia