

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA ALZIRA DO CARMO ARAGÃO

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA**

FORTALEZA

2007

MARIA ALZIRA DO CARMO ARAGÃO

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA**

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

Orientadora: Prof. Dra. Maria Fátima da Silva
Teixeira.

Co-orientador: Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro

FORTALEZA

2007

MARIA ALZIRA DO CARMO ARAGÃO

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA**

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

Aprovada em: ___ / ___ / ___

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Maria Fátima da Silva Teixeira (orientadora)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro (co-orientador)
EMBRAPA Caprinos

Dra. Valeska Shelda Pessoa de Melo (examinadora)
Universidade Estadual do Ceará

A todos os que torceram por mim durante
a execução deste trabalho, dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela ajuda nos altos e baixos durante a execução deste trabalho.

A FUNCAP pelo apoio financeiro em forma de bolsa.

A EMBRAPA Caprinos pelo apoio técnico e estrutural.

A UECE pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Banco do Nordeste pelo suporte financeiro ao projeto.

E de forma especial:

A minha família, mais especialmente, a minha mãe Dalila e minha irmã Meire pelo apoio incondicional em todos os momentos;

A minhas tias Mazé e Conceição, pelo acolhimento e apoio;

Ao Dr. Raymundo Rizaldo, pela amizade e ajuda;

A Dra. Fátima Teixeira (minha orientadora) pela compreensão;

Aos meus amigos de mestrado pelos momentos de alegria e companheirismo;

Aos amigos do LABOVIR, em especial Tânia, pela ajuda em todos os momentos e compreensão;

Aos meus grandes amigos Arquimedes, Elis, Elidiane, Patrícia e Telma pelo companheirismo e amizade;

A minha amiga Dra. Andréia Alice, que mesmo à distância, se manteve presente;

Aos amigos de estágio, em especial Ronaldo e Luciana, tão presentes em minha vida durante este período;

A toda turma da EMBRAPA: Dra. Ângela. Diônes, João Ricardo, Rafael, Felipe, Osmarilda.

Helena, Nóbrega, dona Catarina, Toinho por todos os momentos maravilhosos, felizes e tristes.

*" ... O tempo é algo que não volta atrás.
Por isso plante seu jardim e decore sua alma,
Ao invés de esperar que alguém lhe traga flores ... "*

William Shakespeare

RESUMO

A Maedi Visna é uma enfermidade típica de ovinos, embora possa infectar, também, caprinos. Encontra-se disseminada em todo mundo, exceto na Austrália e Nova Zelândia. No Brasil, é sabida a existência de rebanhos infectados inclusive no Ceará, mas a real situação sanitária não é bem documentada. Possui como característica um longo período de incubação com ausência de manifestações clínicas e lenta produção de anticorpos. Para a detecção desta enfermidade, testes laboratoriais sensíveis são de grande importância para um diagnóstico inicial. Neste contexto, muitos testes já foram empregados, sendo a IDGA, até hoje, o recomendado pela OIE. No entanto, por ser um teste de baixa sensibilidade seu uso já é questionável. O objetivo do presente trabalho foi padronizar o Dot-ELISA, comparando-o com a IDGA. Para tanto, produziu-se antígeno viral (cepa K1514) e a partir da padronização realizada, testou-se 246 amostras de soro ovino. Os testes (Dot-ELISA x IDGA) foram comparados estatisticamente, tendo o Dot apresentado uma sensibilidade superior a IDGA e uma concordância de 93,9%. O Dot-ELISA, portanto, é um teste recomendado para o diagnóstico da Maedi Visna, por apresentar além das características citadas, boa praticidade, sendo de fácil execução e rápido.

Palavras-chave: Maedi Visna, IDGA, Dot-ELISA.

ABSTRACT

The Maedi Visna is a disorder typical of sheep, but can infect also goats. It is spread worldwide, except in Australia and New Zealand. In Brazil, it is known that there are infected herds even in Ceara, but the real health situation is not well documented. It characteristic as a long period of incubation with absence of clinical manifestations and slow production of antibodies. For the detection of this disease, sensitive laboratory tests are of great importance to a diagnóstico original. In this context, many tests have already been employed, and the IDGA, until today, recommended by the OIE. However, as a test of low sensitivity its use is questionable. The goal of this work was standardizing the dot-ELISA, comparing it with the IDGA. For this, it is produced viral antigen (strain K1514) and from the standardization held, tested is 246 samples of serum sheep. The tests (ELISA Dot-x IDGA) were compared statistically, the Dot presented a sensitivity than IDGA and a concordance of 93.9%. The dot-ELISA, therefore, is a test recommended for the diagnosis of Maedi visna, by presenting the characteristics mentioned above, good practical, and easy implementation and fast.

Keywords: Maedi visna, IDGA, Dot-ELISA

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 - Morfologia do MVV (Borderías, 2004).....23
- Figura 2 - ECP provocado pela ação do MVV em células de membrana sinovial caprina. A área destacada corresponde a um sincício formado em que pode observar a presença de nucléolos.....24
- Figura 3 - Estrutura gênica do Vírus Maedi Visna.....26
- Figura 4 - Figura 04: Ciclo viral. 01 e 02: representam a aproximação e adsorção do vírus; 03: fusão do vírus a membrana da célula; 04: liberação da nucleocápside; 05: retrotranscrição; 06: entrada do DNA e integração ao genoma da célula; 07: transcrição; 08: tradução; 09: transcrição do RNA genômico; 10: brotamento e 11: amadurecimento viral (Borderías et al., 2004).....28

ARTIGO: “MAEDI-VISNA VÍRUS: PRODUÇÃO DE ANTÍGENO, ANÁLISE PROTÉICA E ANTIGÊNICA”

- Figura A - Eletroforese de antígeno do vírus Maedi Visna cepa K1514.....60
- Figura B - Immunoblotting do antígeno do vírus Maedi Visna. Verificou-se a presença de sete bandas com reação imunogênica sendo três mais reagentes de peso molecular aproximado de 16, 27 e 50 kDa.....60

ARTIGO: ”DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA”

- Figura 1 - Resultado da padronização realizada. Na vertical encontram-se as diluições do antígeno. Na horizontal encontram-se as diluições do soro, onde A= 1:25 +; B= 1:25 -; C= 1:50 +; D = 1:50 -. Bloqueio utilizado PBS 0,370

Figura 2 - Resultado das padronizações realizadas. Na vertical encontram-se as diluições de antígeno. Na horizontal encontram-se as diluições do soro, onde A= 1:50+; B= 1: 50-; C= 1: 25+; D= 1:25-. Bloqueio utilizado: TTBS. A área marcada corresponde a diluição ótima de antígeno e soro.....70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Quadro.01- Países que registraram a presença do MVV no ano de 2004 na OIE
(Handistatus II /2004 http://www.oie.int/hs2/ci_annee.asp).....22
- ARTIGO 01 - **ARTIGO: “MAEDI-VISNA VÍRUS: PRODUÇÃO DE ANTÍGENO, ANÁLISE PROTÉICA E ANTIGÊNICA”**
- Quadro 1 - Polipeptídeos encontrados nos LVPR segundo vários autores.....54
- ARTIGO 02 **ARTIGO: ”DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA”**
- Tabela 01: Resultados obtidos no teste dos soros pelo Dot ELISA e IDGA.....72

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|------------------------|---|
| μg | Micrograma |
| μl | Microlitro |
| ac | Anticorpo |
| Ag | Antígeno |
| AP1 | Seqncia ativadora da LTR |
| AP4 | Seqncia ativadora da LTR |
| CA | Capsídeo |
| CAE | Artrite Encefalite Caprina |
| CAEV | Vírus da Artrite Encefalite Caprina |
| cm^2 | Centímetro quadrado |
| CO_2 | Dióxido de carbono |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| DAS | <i>Double antibody sandwich</i> |
| DE | Dot-ELISA |
| DFS | Dose formadora de sincício |
| DNA | cido desoxirribonucléico |
| DNAP | DNA proviral |
| E | Especificidade |
| ECP | Efeito citopático |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| Embrapa | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| <i>env</i> | Gene que codifica as proteínas do envelope viral |
| FC | Fixação de complemento |
| <i>fos</i> | Fator celular presente nos macrófagos que participa da ativação viral |
| g | Unidade da força centrífuga relativa |
| <i>gag</i> | Gene viral que codifica as proteínas internas do vírus |
| gp | Glicoproteína |
| H_2O_2 | gua oxigenada |

| | |
|------------|---|
| IDGA | Imunodifusão em gel de ágar |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| <i>jun</i> | Fator celular presente nos macrófagos que participa da ativação viral |
| kDa | Kilodaltons |
| LTR | Seqüências longas repetidas |
| LVC | Lentivírus caprino |
| LVO | Lentivírus Ovino |
| LVPR | Lentivírus de pequenos ruminantes |
| M | Molar |
| MA | Matriz |
| MEM | Meio essencial mínimo |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul |
| mg | Miligrama |
| MHC | Complexo de histocompatibilidade principal |
| MIDGA | Micro-imunodifusão em gel de agarose |
| mL | Mililitro |
| mM | Mili-molar |
| MN | Membrana de nitrocelulose |
| MSC | Membrana sinovial caprina |
| MV | Maedi Visna |
| MVV | Vírus Maedi Visna |
| NC | Nucleocapsídeo |
| NE | Nordeste |
| °C | graus Celsius |
| OIE | Organização Internacional de Epizootias |
| OPP | Pneumonia Progressiva Ovina |
| OPPV | Vírus da Pneumonia Progressiva Ovina |
| ORF | Pequena região do genoma viral |
| p | Proteína |
| PBS | Solução de tampão de fosfato |

| | |
|------------|--|
| PBS-T | PBS Tween-20 |
| PCAEV | Programa de controle da artrite encefalite caprina |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| PEG | Poli(etil)enoglicol |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| PMSF | <i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i> |
| <i>pol</i> | Gene que codifica as enzimas virais |
| pr | Precursor |
| <i>rev</i> | Gene de regulação viral |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| S | Sensibilidade |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SRD | Sem raça definida |
| <i>tat</i> | Gene de regulação viral |
| TCID | Dose inuladora em cultura de tecido |
| TM | Glicoproteína transmembrânica |
| TNE | Tampão Tris-EDTA |
| TR | Transcriptase reversa |
| TTBS | Tris- Tween 20 |
| U3 | Região única não traduzida na extremidade 3' |
| U5 | Região única não traduzida na extremidade 5' |
| UECE | Universidade Estadual do Ceará |
| <i>vif</i> | Gene de regulação viral |
| VPN | Valor preditivo negativo |
| VPP | Valor preditivo positivo |
| WB | <i>Western Blotting</i> |

SUMARIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 09 |
| LISTA DE TABELAS | 11 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | 12 |
| INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 21 |
| 2.1 MAEDI VISNA..... | 21 |
| 2.2 AGENTE ETIOLÓGICO..... | 23 |
| 2.2.1 MORFOLOGIA E BIOLOGIA DO MVV..... | 23 |
| 2.2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA..... | 25 |
| 2.2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO MVV..... | 26 |
| 2.2.3 RESPOSTA IMUNE..... | 28 |
| 2.2.3.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL..... | 29 |
| 2.2.3.2 RESPOSTA IMUNE CELULAR..... | 30 |
| 2.4 PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS..... | 31 |
| 2.4 EPIDEMIOLOGIA..... | 31 |
| 2.4.1 MAEDI VISNA NO BRASIL..... | 31 |
| 2.4.2 TRANSMISSÃO E FATORES PREDISPOANTES..... | 33 |
| 2.5 CONSEQUÊNCIAS ECONÔMICAS..... | 34 |
| 2.6 MAEDI VISNA E OS CÓDIGOS INTERNACIONAIS..... | 35 |
| 2.7 TESTES DIAGNÓSTICOS..... | 37 |
| 2.7.1 IDGA | 38 |
| 2.7.2 DOT ELISA..... | 39 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 4. HIPÓTESE CIENTÍFICA..... | 42 |
| 5. OBJETIVOS GERAIS..... | 43 |
| 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 43 |
| 6. CAPÍTULO I | |
| Maedi-Visna Vírus: produção de antígeno, análise protéica e antigênica..... | 45 |
| 7. CAPÍTULO II | |
| Desenvolvimento e padronização do Dot-ELISA para o sorológico da Maedi | |

| | |
|--|-----------|
| Visna..... | 62 |
| 8. CONCLUSÕES..... | 80 |
| 9. PERSPECTIVAS..... | 81 |
| 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 82 |

1.INTRODUÇÃO

Os Lentivírus ocasionam doenças degenerativas de progressão lenta. Fazem parte deste gênero o Vírus Maedi Visna (MVV) e o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), que acometem ovinos e caprinos, respectivamente, registrando-se, ainda, a infecção cruzada (Pisoni et al., 2005). As principais características dos lentivírus são a capacidade de se manter em latência por longos períodos e a infiltração de células mononucleares em órgãos-alvos, como pulmões, articulações, glândula mamária e sistema nervoso central (Pasick, 1998).

A porta de entrada do vírus em países livre do agente é a comercialização não criteriosa de animais e germoplasma, visto que a entrada destes não só insere o vírus, como, este serve como disseminador do microorganismo.

Os lentivirus têm capacidade de permanecer em latência por muitos anos, podendo permanecer, inclusive assintomáticos por toda a vida, por esta razão, torna-se inviável realizar um diagnóstico exclusivamente clínico. Neste contexto, são utilizados os testes diagnósticos baseados na sorologia (métodos de detecção indireta), aos quais incluem o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), a imunofluorescência indireta e a IDGA (Imunodifusão em Gel de Agarose).

A IDGA é um teste amplamente utilizado para fins de triagem, sendo o indicado pela OIE em programas de controle. Tem como característica o fato de sua especificidade (E) ser bem superior a sensibilidade(S), requerendo, ainda, de 48 a 72h para obtenção do resultado final (OIE, 1996). Como exemplo de um programa bem sucedido utilizando esta estratégia diagnóstica, destaca-se o **PCAEV**- implantado pela Embrapa Caprinos (Embrapa, 1996).

Além das técnicas citadas, pode-se citar, também, os métodos de diagnóstico direto como a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) que requer equipamentos caros, além de exigir maiores cuidados acerca de contaminações, muito embora seja mais sensível que as provas anteriormente citadas. É fato, entretanto, que todos os testes apresentam suas vantagens e desvantagens (Andrés et al., 2005).

O Dot Blot, também conhecido como Dot-ELISA, Dot immunobinding assay, Dot-Blot ELISA é um teste alternativo e viável já padronizado por Pinheiro (2001) para o diagnóstico da CAEV. Este exame baseia-se na utilização de uma membrana de nitrocelulose (MN) como

suporte de revelação da reação antígeno (ag) - anticorpo (ac), que se dá por meio da formação de cor, apresentando S e E semelhante ao ELISA. Devido à praticidade com possibilidade de realização em campo, o fato de não requisitar equipamentos sofisticados e por ser um diagnóstico rápido, pois o resultado é obtido em 1,5 hora torna-se interessante e necessário testá-lo para Maedi Visna (MV).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MAEDI VISNA

O Vírus Maedi Visna (MVV) pertence ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretroviridae (Lentivirinae)* (ICTV, 2006). É considerado, juntamente com o CAEV, como protótipo dos Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) (Callado et al., 2001). Está relacionado, ainda, com os vírus da imunodeficiência bovina, anemia infecciosa equina, imunodeficiência símia, imunodeficiência felina e imunodeficiência humana (Brodie, 1992). O primeiro relato da existência dos LVPR se deve a Sigurdson (1954), na Islândia, o qual descreveu as sintomatologias atribuídas ao MVV. Destaca-se, no entanto, que a existência da MV é conhecida há muitos anos, havendo relatos que datam de 1915 (Marsh, 1923 *apud* Pasick, 1998). Atualmente, pertence a lista B de doenças de notificação obrigatória da OIE.

Ressalta-se, entretanto, que Sigurdson (1954), em sua descrição, considerou Maedi e Visna como sendo dois vírus distintos, sendo que Maedi era considerada um agente indutor de sintomatologias relacionadas ao pulmão e Visna a quadros clínicos nervosos. Hoje se considera ambos como pertencentes a mesma cepa (Straub, 2004).

A denominação Maedi Visna varia com a região geográfica, sendo conhecida como pneumonia progressiva ovina (OPP) nos Estados Unidos, La Bouhite, na França e Zwogerzieckte, na Holanda (Straub, 2004).

O ciclo viral é dependente da maturação de monócitos em macrófagos, podendo demorar anos até sua manifestação clínica, a qual é mais evidente em animais velhos.

CAEV e MVV estão, atualmente, distribuídas em todo mundo (Pasick, 1998). No caso de MV, ressalta-se que a Nova Zelândia e a Austrália são países nos quais jamais houve registro da presença deste agente nos rebanhos (OIE, 2005). Na tabela 01 estão relacionados os países onde a MV foi relatada no ano de 2004.

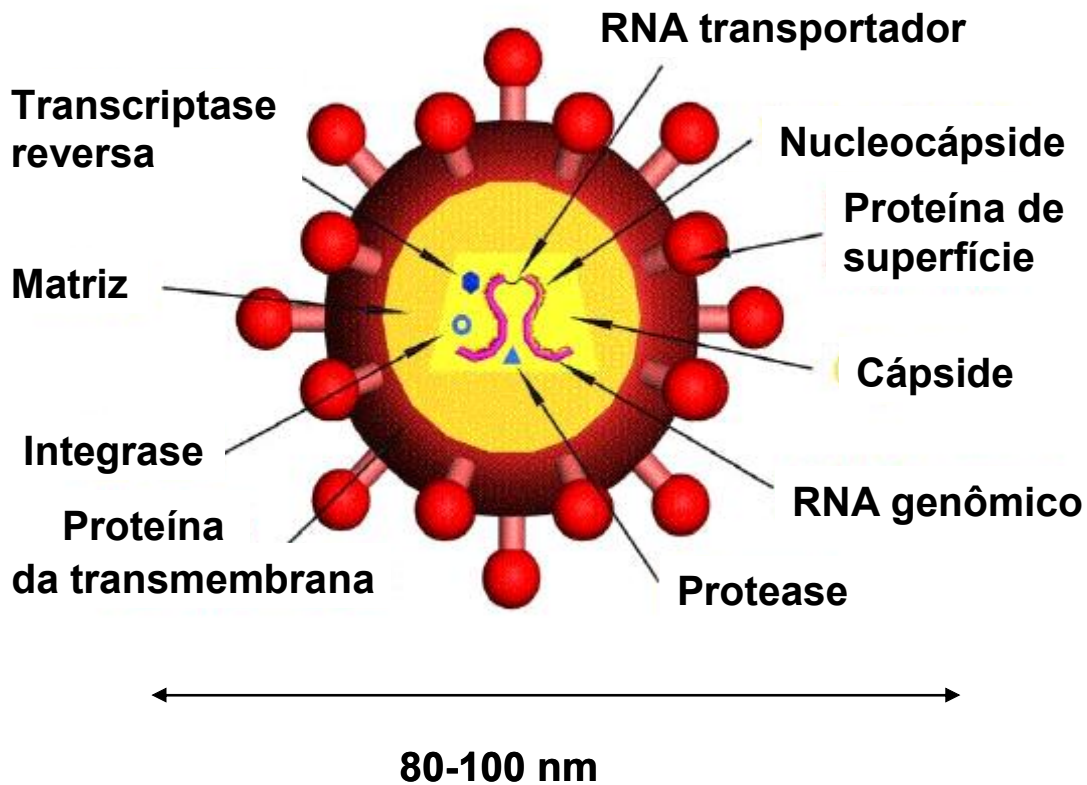
| | |
|---------------------------|---------------------------|
| Alemanha | Iraque |
| Andorra | Irlanda |
| Argentina | Islândia |
| Áustria | Ilhas Virgens |
| Bélgica | Letônia |
| Bulgária | Luxemburgo |
| Canadá | Namíbia |
| República Checa | Noruega |
| Chile | Países Baixos |
| Chipre | Polônia |
| Dinamarca | Portugal |
| Eslováquia | Reino Unido/ Grã Bretânia |
| Espanha | Romania |
| Estados Unidos da América | São Tomé e Príncipe |
| Finlândia | Sudáfrica |
| França | Suécia |
| Grécia | Suíça |
| Hungria | |

Quadro.01: Países que registraram a presença do MVV no ano de 2004 na OIE
(Handistatus II /2004 http://www.oie.int/hs2/ci_annee.asp)

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

2.2.1 MORFOLOGIA E BIOLOGIA DO MVV

A morfologia do MVV é semelhante a dos demais retrovírus. Apresenta espículas distribuídas em sua superfície, as quais chegam a 8 nm de comprimento. O vírus é composto de proteínas (60%), lipídios (35%), carboidratos (3%) e RNA (2%). É sensível a agentes químicos como: formaldeído, éter, clorofórmio, tripsina e ribonucleases, porém é resistente a desoxiribonucleases pelo fato de não possuir DNA. Pode ser inativado a 56 °C por 10 minutos, porém tem sua infecciosidade mantida por até cinco meses, suportando, ainda processos de congelamento (Borderías, 2004) (Fig. 02).



.Figura 01: Morfologia do MVV (Borderías, 2004)

São vírus envelopados, os quais possuem além do envelope (fosfolipídico) - resultante da fusão do vírus a membrana plasmática da célula hospedeira no momento de saída do vírus (mimetismo viral) - um nucleocapsídeo, um nucleóide (concêntrico) e uma matriz protéica. Têm diâmetro que varia de 80 a 100 nm (ICTV, 2006).

Os Lentivírus são molecularmente classificados em quatro grupos (A-D) (Shah, 2004a):

- Grupo A (subtipos A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7): mais relacionados ao MVV
- Grupo B (subtipos B1 e B2): relacionados ao CAEV
- Grupo C e grupo D: ainda não totalmente descritos por terem sido caracterizados através de poucos isolados e apenas pela seqüência do gene *pol*.

As diferentes cepas conferem características distintas ao vírus, existindo aquelas rápidas, caracterizadas pelo rápido efeito citopático (fig. 01) e elevados índices de replicação, com conseqüentes sintomas mais severos da enfermidade. Há, ainda, cepas mais lentas, as quais apresentam características contrárias as citadas anteriormente, levando, inclusive, ausência de sinais clínicos (Borderías, 2004). As cepas laboratoriais replicam melhor em culturas de fibroblastos e as cepas isoladas de tecidos infectados provenientes de animais doentes multiplicam-se mais eficientemente em macrófagos (Narayan et al., 1993).



Figura 02: Efeito citopático (ECP) provocado pela ação do MVV em células de membrana sinovial caprina. A área destacada corresponde a um sincício formado em que pode observar a presença de nucléolos.

2.2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

No MVV, molecularmente existem genes que controlam todo o processo de replicação viral. Segundo Clements ; Payne (1994), o processo patológico advindo da infecção lentiviral se deve às características genéticas dos vírus. Ainda neste trabalho, os autores afirmam haver grupos de genes codificando as proteínas virais, bem como determinando o tropismo do vírus.

A organização gênica do MVV inclui a presença das ORFs (open reading frames), que agrupam os genes *tat*, *rev* e *vif* (Narayan et al., 1993), os quais codificam proteínas reguladoras (Clements; Payne, 1994). Na estrutura gênica ainda são incluídos os genes: *gag*, que codifica proteínas do capsídeo; *pol*, responsável pela codificação de proteínas, como a TR (transcriptase reversa) e *env*, codificador das gp (glicoproteínas) do envelope viral (Zaha, 2000). Existem, ainda, as LTRs (long terminal repeat), que possuem as regiões U3 e U5 (Zaha, 2000). As LTRs localizam-se nas extremidades, sendo regiões não codificadoras, mas que apresentam elementos promotores da transcrição, sendo que as regiões 5' LTR e 3'LTR servem como ponto de início e término do processo (Clements; Payne, 1994). Estas regiões estão implicadas na habilidade do vírus em sofrer replicação em células distintas, contribuindo, assim, para o estabelecimento do tropismo celular (Clements; Payne, 1994; Agnarsdóttir et al., 2000) (Fig 03).

Proteínas do gene *gag* (Borderías, 2004):

- p25 (CA): proteína da cápside viral;
- p14 (NC): proteína da nucleocápside viral;
- p17 (MA): proteína da matriz, cuja função é unir o cápsideo ao envelope.

Proteínas do gene *pol* (Borderías, 2004):

- TR: faz a transcrição do RNA em DNA;
- Protease: atua nos precursores das proteínas, promovendo a maturação do vírus;
- Integrase: promove a união do DNA viral ao DNA da célula hospedeira;
- UTPase: previne a ocorrência de mutações.

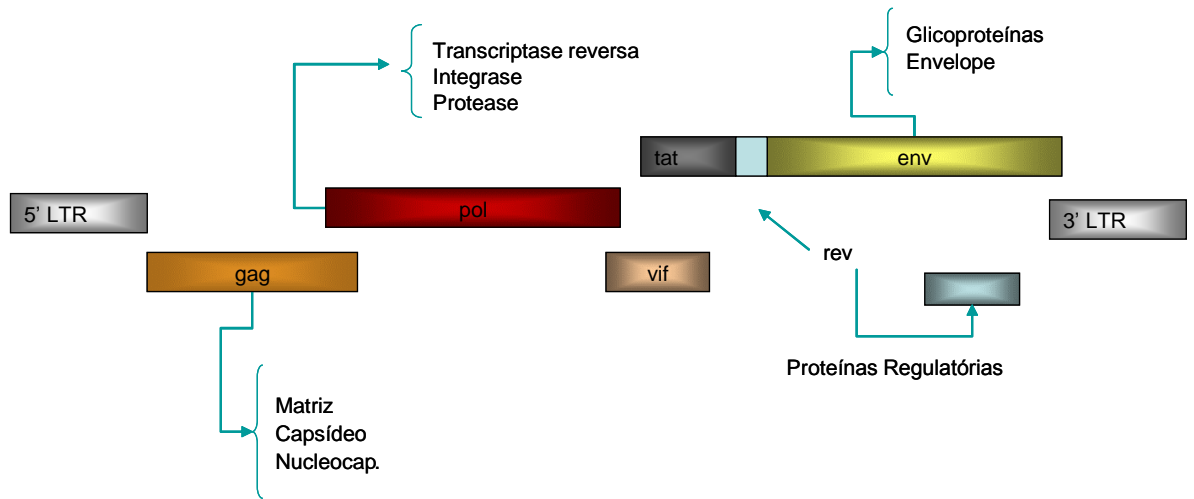


Figura 03: Estrutura gênica do Vírus Maedi Visna

Proteínas do gene *env* (Borderías, 2004):

- Produz a glicoproteína gp 160, a qual se divide na gp 135 (glicoproteína de superfície) e gp 44 (transmembrânica, que associada a gp 135, forma a estrutura de superfície viral).

A gp 135 é responsável pela interação do vírus à célula hospedeira. Devido ao processo de liberação do vírus, no qual ao ser expelido da célula, carrega consigo parte da membrana plasmática da mesma, ocorre o fenômeno do mimetismo viral. Este fenômeno confere ao vírus a capacidade de não ser reconhecido como uma partícula estranha, favorecendo ao mecanismo de escape.

2.2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO MVV

O vírus MV apresenta um tropismo preferencial pelos monócitos, os quais amadurecem transformando-se em macrófagos. Portanto, o ciclo de vida do MV está diretamente

relacionado a maturação dos monócitos, em virtude da ativação de fatores específicos nos macrófagos. Assim, os monócitos infectados circulam livremente até se fixarem nos tecidos, onde maturam, sem serem identificados pelo sistema imune, num mecanismo denominado “cavalo de Tróia” (Borderías, 2004).

Quando maduros, os macrófagos infectados apresentam altos índices de replicação viral., existindo regiões que apresentam fatores contribuintes ao processo de replicação. A LTR do vírus apresenta regiões denominadas AP1 e AP2, indutores da transcrição viral. Além destas, há ainda as proteínas *Jun* e *Fos*, presentes no núcleo de macrófagos e que agem diretamente nestas regiões estimulando a transcrição viral. (Narayan et al., 1993). Segundo Brodie et al. (1995), entretanto, todas as células podem ser infectadas pelo MVV, mas a infecção (ocorrência do ciclo viral completo) pode estar limitado a alguns tipos de células, visto que foi detectado a presença de RNA viral em vários tipos celulares atípicos ao processo infeccioso conhecido. É provável que a não infecção dos linfócitos seja devido a ausência de receptores (Gendelman et al., 1986).

O MVV segue o ciclo de vida dos demais retrovírus. Inicialmente, o vírus se liga a célula-alvo por meio da interação com receptores celulares específicos. Quando encontra o receptor, o vírus se adere membrana plasmática da célula hospedeira, sendo adsorvido e decapsidado, liberando seu RNA no citosol, o qual é transcrito por meio da TR. O RNA, já transcrito em DNA viral, entra no núcleo da célula e com o auxílio da enzima integrase se acopla ao DNA da mesma na forma de DNA proviral (DNA_p). A partir daí o núcleo promove a formação de RNA mensageiro que vai atuar nos locais de produção de proteína da célula para que os mesmos produzam proteínas virais. Durante dois ou três dias o DNA_p é replicado, podendo haver, ainda, a transcrição do mesmo, produzindo RNA para novos genomas virais e para codificar proteínas do capsídeo e do envelope. A liberação do vírus ocorre quando este se encontra pré-formado. Nesta etapa, o vírus adere a membrana plasmática da célula hospedeira (Narayan et al., 1993; Tortora et al., 2000) e é liberado, levando em seu envelope não só glicoproteínas virais, como da célula (Fig.03). O intenso processo de liberação do vírus pela célula pode levar a sua destruição.

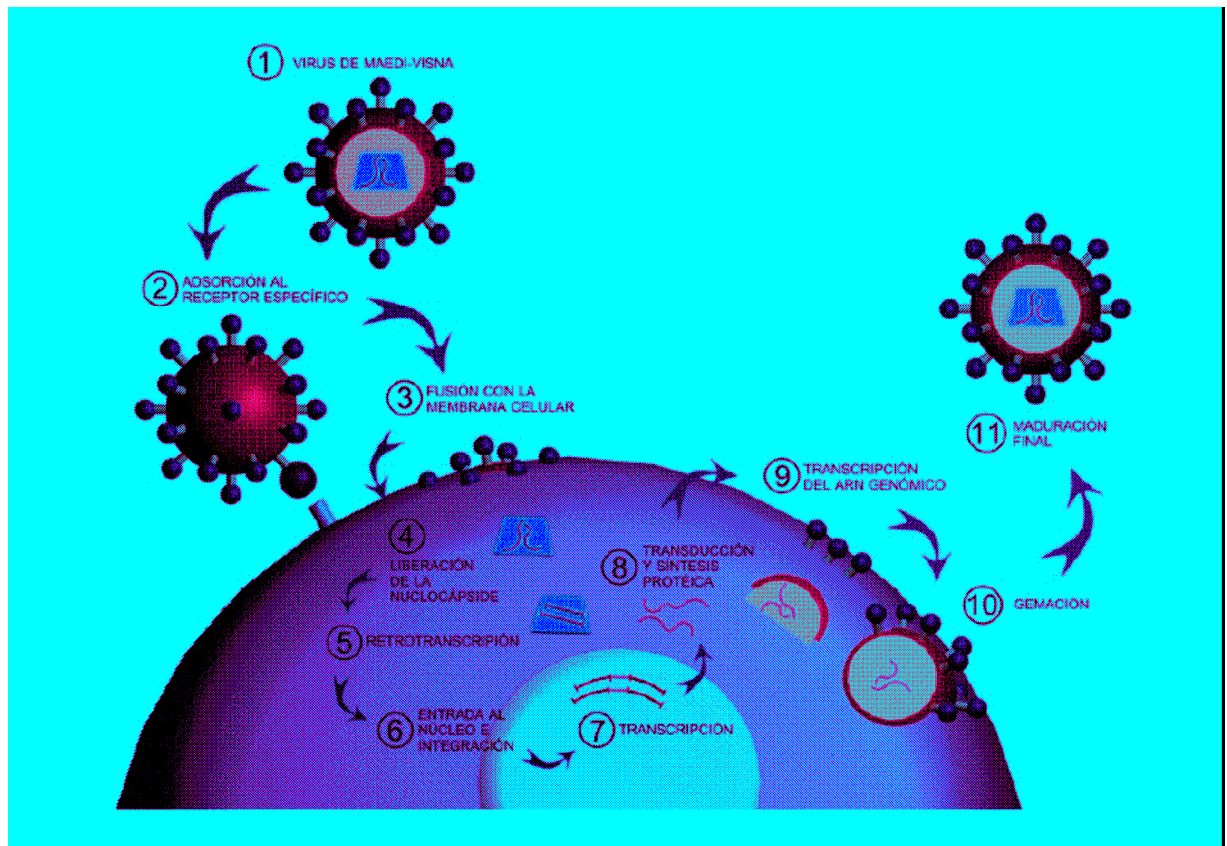


Figura 04: Ciclo viral. 01 e 02: representam a aproximação e adsorção do vírus; 03: fusão do vírus a membrana da célula; 04: liberação da nucleocápside; 05: retrotranscrição; 06: entrada do DNA e integração ao genoma da célula; 07: transcrição; 08: tradução; 09: transcrição do RNA genômico; 10: brotamento e 11: amadurecimento viral (Borderías et al., 2004).

2.2.3 RESPOSTA IMUNE

Tanto a resposta humoral, como a celular podem ser ativadas pela infecção (Bruland, 2003), tendo ação estimuladora ou bloqueadora no desenvolvimento do ciclo viral. É fato, ainda, que a resposta imune não consegue eliminar a infecção (Borderías, 2004).

Na resposta humoral se destacam os anticorpos neutralizantes, ressaltando-se, ainda, a existência de anticorpos antifusionais (Narayan et al., 1993). A resposta celular regula a resposta humoral e ativa macrófagos (Borderías, 2004).

2.2.3.1 RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Os anticorpos neutralizantes têm a habilidade de prevenir a infecção nas células, tendo ação inclusive sobre os hospedeiros já infectados, retardando a replicação viral (Narayan et al., 1993). Os anticorpos neutralizantes além de promoverem a seleção de variantes (mutantes) virais acabam, também, colaborando para os mecanismos de evasão do vírus ao sistema imunológico do hospedeiro (Kennedy-Stoskopof ; Narayan, 1993). Estudando os mecanismos de ação deste tipo de anticorpo, os mesmos autores verificaram que estas moléculas têm uma afinidade por suas células-alvo (macrófagos) superior à atração dos anticorpos ao vírus, facilitando, assim, a persistência viral no hospedeiro. Outro aspecto observado foi o de que os anticorpos neutralizantes agem inibindo a ligação dos vírus aos receptores celulares (adsorção viral).

Anticorpos antifusionais impedem a fusão de células infectadas e não-infectadas ou susceptíveis à infecção (Narayan et al., 1993). Crane et al. (1988) estudando os mecanismos de ação dos anticorpos anti-fusionais e neutralizantes, verificaram que estes agem de forma diferente um do outro apresentando, inclusive, diferenças nos epítomos em que agem. Os anticorpos anti-fusionais apresentam cinética destinada de maneira que conferem ao vírus duas vias de entrada no hospedeiro: pela fusão ou pela penetração e infecção viral. Ainda, segundo estes autores, os ac anti-fusionais desempenham mais eficientemente a função de proteção contra a infecção pelo fato de que, ao contrário dos ac neutralizantes, não necessitam de um longo período de incubação, agindo, assim, de forma mais rápida, bloqueando a ação viral.

Kajikawa et al. (1990), verificou que após duas semanas de inoculação, surgiram os primeiros anticorpos, os quais foram direcionados a proteína p25, seguido pelos anticorpos direcionados a p16 e p25 e pela glicoproteína gp105. Singh et al. (2006) verificaram a presença de anticorpos contra a p25, p16, p14 nos dias 24, 45 e 100 dias pós inoculação com MVV respectivamente.

2.2.3.2 RESPOSTA IMUNE CELULAR

A progressão lenta típica das lentivirose é consequência da resposta imune desencadeada pelos linfócitos B e células T, porém não são capazes de barrar a replicação e disseminação viral (Bird et al., 1993).

Agem neste tipo de resposta, os complexos de histocompatibilidade principal (MHC) I e II (Borderías, 2004):

- MHC I: expresso por meio de reconhecimento do antígeno presente no citosol celular sendo, então, reconhecidos pelas células CD8+, as quais destroem as células infectadas.

- MHC II: ao se encontrarem com as células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B) e quando há a formação do complexo antígeno-MHCII são liberados estímulos para a proliferação dos linfócitos T (que se diferenciam em CD8+) e linfócitos B.

As células CD4 agem na produção de ac, bem como na manutenção dos níveis de células CD8, desempenhando, portanto, um papel importante no desenvolvimento e controle da resposta imune (Torstenisdottir et al., 2007). As células CD4 e os linfócitos B desempenham a função de controle da infecção vírica pelo fato de secretarem tanto citocinas, como anticorpos (Erikson et al., 1999).

As células CD8+ podem aumentar ou diminuir o aparecimento de lesões. Quando interagem com macrófagos infectados lisando-os, estimulam a liberação de citocinas e a formação de lesões. Por outro lado, na ocorrência da lise dos macrófagos infectados, há uma redução da carga viral e retardamento da formação de lesões (Narayan et al., 1993).

2.4 PATOGENIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Os lentivírus contornam os mecanismos da resposta imune e causam lesões imunomediadas (Brodie et al., 1998).

Nem todos os animais infectados desenvolvem sintomas clínicos de MV (Sota, 2004). Embora Maedi e Visna sejam considerados como pertencentes a mesma cepa (Straub, 2004), é sabido que os sintomas são distintos. Maedi corresponde às seguintes manifestações: tosse, dispnéia, perda de peso, mastite e/ ou artrite. Visna corresponde a sintomatologias nervosas (Straub, 2004). É fato, entretanto, que os aspectos relacionados a Maedi são mais comuns (Chistodouloupoulos, 2006). Em ambos os quadros, a morte ocorre até dois anos após o início dos sintomas. Além disso, mesmo não causando imunodepressão, existem microorganismos que infectam paralelamente o animal e que evidenciam o quadro clínico, quando há uma identidade com o órgão-alvo do vírus, como, por exemplo, a presença de helmintos pulmonares (Straub, 2004). Os sintomas da doença podem aparecer juntos ou alternadamente (Brodie et al., 1998).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

2.4.1 MAEDI VISNA NO BRASIL

No Brasil o primeiro isolamento foi feito por Moojen et al. (1986). A EMBRAPA e a UECE têm feito levantamentos sorológicos no Ceará, que indicaram a presença de Maedi Visna na região (Teixeira et al., 1998). Em levantamento sorológico realizado por Almeida et al. (2003), de uma amostra de 60 animais destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza, 31,67% foram diagnosticados como soropositivos para MV.

O primeiro isolamento do vírus em cultivo de células foi realizado por Almeida et al. (2001) de um ovino proveniente de Maranguape, região metropolitana de Fortaleza. O animal soro reagente pela IDGA teve macrófagos co-cultivados com fibroblastos e o ECP característico teve seu início com 48 horas seguido de lise após 12 dias.

Os registros mais expressivos relacionados aos LVPR são direcionados a região Nordeste (NE). Os levantamentos sorológicos no Brasil acerca da MV ainda são muito incipientes (Castro; Melo 2001).

Gouveia et al. (2003) afirmaram ser a CAE uma enfermidade amplamente disseminada no Brasil, porém a Maedi Visna, pelo menos até 1999, tinha seus registros restritos a alguns estados da região NE. Ainda em 2003, Gouveia e colaboradores analisaram ovinos e caprinos de Minas Gerais no tocante aos LVPR, verificando na ocasião que 5,9 % dos 2350 soros caprinos estudados e 7,7 % dos soros ovinos eram positivos, respectivamente ao CAEV e ao MVV.

Araújo et al. (2004), analisando ovinos provenientes de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza, verificaram que 4,96 % dos 222 animais eram positivos ao MVV.

Primo et al. (2005) estudaram 415 amostras de ovinos oriundas da região Norte do Ceará e concluíram que 4,96 % eram positivas.

Assis et al. (1994) pesquisando a existência de anticorpos contra LVPR em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará, encontraram uma prevalência de 33,33 %; 29,70 %; 12,82 % e 27,47 %, respectivamente.

Silva (2003) analisou amostras de soro ovino no estado do Rio Grande do Norte, verificando, na ocasião, que das 315, 21,3 % foram positivas a MV.

Costa et al. (2007) investigaram a presença de LVPR em 558 soros ovinos no estado de Pernambuco, verificando a presença de 1,07 % de amostras positivas. Ainda em PE, Oliveira et al. (2006) analisando, também, amostras de soro caprino e ovino provenientes de abatedouros, notificaram que 3,8 % e 5,2 %, respectivamente eram positivos a CAEV e a MV.

Tal escassez de dados reflete a necessidade de serem realizados inquéritos sorológicos no intuito de saber as reais condições sanitárias dos rebanhos ovinos nacionais, contribuindo, até mesmo, para um impulso na cadeia produtiva.

2.4.2 TRANSMISSÃO E FATORES PREDISPOANTES A INFECÇÃO

Em se tratando de transmissão dos LVPR, existem duas grandes vias: horizontal e vertical.

A transmissão vertical inclui a transmissão intrauterina e transplacentária, a qual, segundo Blakclaws et al. (2004) são difíceis de ser avaliadas devido os resultados serem muito divergentes.

Para Legianagoikoa et al. (2006) a transmissão horizontal representa maior risco de infecção que a via vertical no tocante ao colostro. A transmissão horizontal, ainda, envolve o contato direto ou indireto entre os animais, o sêmen, o meio ambiente, a via iatrogênica e produtos de origem animal (Blakclaws et al. 2004).

IDADE: A soroconversão aumenta com a idade até quatro anos, sendo tal fato ainda não entendido. Uma das possíveis explicações seria a capacidade dos ovinos mais novos em controlar a infecção, ao contrário dos mais velhos, que já sofreram estresses decorrentes dos sistemas de exploração produtiva a que são submetidas (Legianagoikoa et al., 2006). Ainda segundo estes autores, fêmeas lactantes são mais susceptíveis a infecção por MVV por estarem imunocomprometidas.

COLOSTRO: É visto como um grande responsável pela a infecção em animais mais novos, neste contexto, metodologias preventivas tem sido aplicadas, como a substituição do colostro ovino pelo bovino e o tratamento térmico. Estes tipos de práticas têm sido estudado (Álvares et al., 2005; Álvares et al., 2006). Os resultados revelaram que tais procedimentos não barraram a infecção, sendo que estes métodos impedem o estímulo das defesas naturais provenientes da salivacão durante a mamada e a desativação de algumas proteínas colostrais com atividade anti-viral durante a pasteurização. Segundo estes autores a contribuição do colostro proveniente de cabras infectadas e ministrado aos cordeiros em condições naturais, tem pouco efeito no aumento da soroprevalência. Além disso animais alimentados com colostro bovino soroconverteram quando misturados aos cordeiros alimentados de forma natural. Vale ressaltar,

ainda, que Preziuso et al. (2004) demonstraram a importância da transmissão colostrar, sendo o intestino delgado e os linfonodos mesentéricos sítios de entrada do vírus.

RAÇAS: Alguns estudos sugerem a relação da susceptibilidade de algumas raças ao MVV, porém não conseguem chegar a conclusões válidas pelas metodologias empregadas. Fatores como o número de amostras, características genéticas, formas de exposição, tipo de cepas e suas respectivas doses e métodos de exposição são alguns dos entraves para um maior entendimento (Brodie et al., 1998).

MANEJO: O manejo também merece especial atenção, visto que quando inadequado age facilitando a proliferação viral (Ayelet et al., 2001), a qual varia entre países e regiões (Leginagoikoa et al., 2006). Alguns estudos indicam, ainda, que o nível de contaminação do rebanho, assim como o grau de contato entre os animais é determinante na proliferação viral no rebanho (Leginagoikoa et al., 2006).

Além disto cita-se, ainda, a comercialização de produtos de origem animal, como forma de disseminação do vírus, incluindo o uso de sêmen contaminado. Num trabalho realizado por De La Concha Bermejillo et al. (1986), foi detectada a presença de MV no sêmen em animais infectados por *Brucella ovis*, assim como em caprinos, sem nenhuma infecção concomitante (Andriolli et al., 1999).

2.5 CONSEQÜÊNCIAS ECONÔMICAS

Os cuidados advindos da necessidade de se controlar, ou mesmo erradicar, a MV são decorrentes, principalmente, das conseqüências econômicas. Já instalada nos rebanhos, sobretudo aqueles destinados à produtividade leiteira e criados em regime intensivo e semi-intensivo, o vírus dissemina-se, provocando sintomatologias que afetam a produtividade e reprodução animal. Quadros sintomatológicos caracterizados, economicamente, pela baixa produção leiteira aliada a queda na qualidade do mesmo, baixo peso dos cordeiros ao nascer e pouco ganho de peso dos animais, mesmo com a manutenção do apetite, ocorrem com animais infectados por MVV. Keen et al. (1997) afirmaram que a queda na produtividade é efeito direto da ação viral, sendo,

indiretamente, responsável pela alteração negativa na capacidade de gestação das ovelhas. Já os parâmetros reprodutivos e comportamentais tanto de machos quanto de fêmeas caprinos não têm sido observado nenhum efeito negativo dos LVPRs (Andrioli et al, 2002).

Segundo Peterhans et al. (2004), são poucas as informações acerca das perdas econômicas decorrentes de LVPRs e, além disso, são contraditórias, mas é fato que há influências nos parâmetros relacionados à produção.

A queda na produção leiteira advém não só de lesões decorrentes do MV, mas, também devido a diminuição do metabolismo, que é consequência da perda de peso (Chistodoulopoulos, 2006). O animal consegue manter o apetite, mas não metaboliza o alimento e, portanto, não possui elementos que favoreçam a produção de leite. O que é produzido, além de ser em pouca quantidade e baixa qualidade, ainda possui uma quantidade aumentada de células somáticas (Peterhans et al. 2004).

2.6 MAEDI VISNA E OS CÓDIGOS INTERNACIONAIS

Num mercado cada vez mais exigente quanto a critérios sanitários, em se tratando do comércio de animais e, por consequência, de seus produtos, torna-se importante efetuar um controle eficiente destas enfermidades. Dois dos maiores entraves no rastreamento dos animais infectados são a soroconversão tardia e a latência das manifestações clínicas. Na prática, animais afetados nem sempre são detectados como positivos visto que, muitas vezes, não produzem um volume de ac detectáveis pelos testes sorológicos.

Ayelet et al. (2001) relataram que a entrada da MV na Etiópia teria sido em virtude da introdução de raças exóticas provenientes do Reino Unido e de Israel. Sihnovenen et al. (1999) destacaram a necessidade de haver um controle no tocante a testes periódicos e restrição a movimentação de animais. Demonstraram, ainda, que na Finlândia os resultados dos testes em animais são de suma importância já que, em muitos casos, os animais analisados não apresentavam sinais clínicos da doença.

Para a OIE é necessário, durante as realizações de compra e venda de animais, que os países exportadores apresentem um certificado internacional em que seja especificado o status sanitário do rebanho quanto a Maedi Visna. Neste documento, deverão constar garantias de que, pelo menos, nos últimos três anos não tenha havido casos de MV (OIE, 2005). Para a OIE, reconheça um rebanho como livre da doença é necessário:

- que o rebanho esteja localizado em uma região livre da doença
- que nos últimos cinco anos não tenha sido registrado nenhuma evidência da presença de animais infectados
- que todos os casos de MV sejam notificados e as suspeitas investigadas
- ovinos com idade superior a três anos sejam negativos a MV por até cinco anos
- que ovinos introduzidos sejam provenientes de áreas que estejam certificadas como livres da MV nos últimos cinco anos
- todo material biológico para fins reprodutivos seja certificado como provenientes de animais livres da doença

O MERCOSUL (Mercado Comum do Sul) também faz exigências sanitárias seguindo, em linhas gerais, o que a OIE recomenda. De acordo com as resoluções 65/94 e 66/94 do MERCOSUL, os países que integram o bloco devem ser criteriosos quanto ao país de origem dos animais, exigindo, inclusive a negatividade dos testes há, pelo menos, três anos, em acordo com as resoluções 65/94 e 66/94 (Pinheiro, 2001).

O Brasil possui o Programa Nacional de Sanidade Caprina e Ovina, que aborda o Plano Nacional de Vigilância de Sanidade Caprina e Ovina, o qual fornece as diretrizes sanitárias relacionadas a caprinovinocultura, no tocante as lentivirose. Este plano estabelece a IDGA como teste de rotina e o *western blotting* como alternativa nos casos de duvidosos (BRASIL, 2004a; BRASIL, 2004b).

A implantação de programas de controle/ erradicação são ações que necessitam de suporte financeiro alto. Segundo Pinheiro et al. (2006) o custo de cada teste IDGA, ELISA E Dot-Blot para CAE são US\$ 0.67; US\$ 1.00 e US\$ 1.22 para o IDGA, *Dot Blot* e ELISA indireto, respectivamente., respectivamente e os mesmos necessitam ser realizados semestralmente ou anualmente de acordo com o programa e a evolução do mesmo.

2.7 TESTES DIAGNÓSTICOS

Para a escolha do teste diagnóstico duas características devem ser observadas: S e E. Segundo Soares (2001), sensibilidade refere-se a porcentagem de indivíduos verdadeiramente infectados que o teste está habilitado a qualificar como positivo. Ainda segundo este autor, a especificidade corresponde a porcentagem de indivíduos sabidamente negativos e que o teste reconhece como negativo. Para as LVPR não existe um padrão ouro (Peterhans et al., 2004) porém a grande quantidade de testes existentes e o sucesso dos programas de controle, refletem a eficácia dos testes disponíveis.

Existem métodos diretos e indiretos de detecção do vírus. Os métodos diretos incluem o isolamento viral, imunofluorescência direta, imunofluorescência indireta, imunoperoxidase, microscopia eletrônica, hibridização dos ácidos nucléicos e PCR. Os métodos sorológicos estão inclusos nas formas de detecção indireta, visto que se baseiam não na percepção do patógeno, mas nos ac que eles estimulam a formar no organismo. Os indiretos incluem Dot-Blot, ELISA, aglutinação em látex, soroneutralização, fixação do complemento, inibição da hemaglutinação, imunodifusão e radioimunoensaio (Wize et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial é importante não só nos casos em que há ausência de manifestações clínicas, como, também, é utilizado para o diagnóstico confirmatório (OIE, 2005).

Várias técnicas, por vezes, mais sensíveis são, no entanto, mais laboriosas. Estas dificuldades incluem a aquisição de equipamentos sofisticados, equipe treinada, execução demorada, cuidados com contaminações, além do fato de serem geralmente caras. Neste contexto inserem-se técnicas como a PCR. Assim como o *western blotting*, usado para confirmar resultado, no caso de dúvidas (Houwers; Schaake, 1987).

Em se tratando de MV, é sabido a utilização de muitas técnicas, para a identificação do vírus, entre as quais incluem-se: isolamento viral (Brodie et al., 1995), PCR (Brodie et al., 1995; Leginagoikoa et al., 2006), ELISA (Houwers et al., 1982; Howers & Schaake, 1987; Brodie et al., 1995; Pinheiro, 2001; Hermann et al., 2003ab; Dantas, 2004; Leginagoikoa et al.,

2006), IDGA (Knowles et al., 1994; Abreu, 1996; Abreu et al., 1998; Pinheiro, 2001; Lara et al., 2002; Reischaka et al., 2002; Araújo et al., 2004; Dantas, 2004), imunofluorescência indireta (Reishack et al., 2004; Lara et al., 2002), imunohistoquímica (Brodie et al., 1995; Preziuso et al., 2004), hibridização *in situ* (Brodie et al., 1995; Preziuso et al., 2004), fixação do complemento (Houwers et al., 1982) e histopatologia (Brodie et al., 1995). Entre os testes sorológicos, os mais comumente utilizados são a IDGA e o ELISA (OIE, 2005). A IDGA é o teste mais usado para o diagnóstico das LVPR, sendo este recomendado pela OIE para uso em programas de erradicação. Ocasionalmente produz resultados falso-negativos (Knowles, 1997). Outro teste bastante utilizado é o ELISA, sobretudo o ELISA indireto, o qual é mais sensível que o IDGA, entretanto mais oneroso.

O Dot-ELISA vem sendo utilizado no estudo e diagnóstico de enfermidades tanto humana quanto em animais domésticos em diferentes áreas como parasitologia, bacteriologia e virologia. Nas viroses desenvolveu-se *Dot-Blot* para dengue (Branch ; Levet.,1999) Sarampo (Vaz de Ilma *et al.*, 1994), Caxumba (Leonardi *et al.*, 1990), New Castle (Roy ; Venugopalan, 1999), Língua azul (Afshar *et al.*, 1992), Adenovirose (Ribas Antunez et al., 1996), Encefalite Oeste Equina (Boctor *et al.*, 1989), CAEV (Pinheiro, 2001; Pinheiro et al., 2006). Este teste apresenta vantagens quanto a confiabilidade e rapidez.

2.7.1 IDGA

A IDGA é um teste padrão recomendado pela OIE. Tem sido utilizado há bastante tempo nos programas de controle e erradicação das LVPR. E, embora sua baixa sensibilidade, tem se mostrado bastante eficiente nestes casos. Devido a soroconversão tardia e a formação lenta de anticorpos, existe a possibilidade de ocorrer resultados falso-negativos, já que para a formação das linhas de precipitação, são necessárias várias interações ag-ac. Este teste não requer a utilização de aparelhagem sofisticada. É utilizado por muitos autores como um teste de triagem de rebanhos em experimentos que visam separar animais positivos e negativos (Williams-Fulton;

Simard, 1989) ou mesmo para efeito de comparação em projetos de padronização de novas técnicas (Pinheiro, 2001).

Sua utilização como teste de triagem permite ter um panorama sobre o status sanitário do rebanho de uma dada região. Tem sido empregado, portanto, em muitos trabalhos epidemiológicos (Sihvonen et al., 1999; Ayelet et al., 2001; Karanikolau et al., 2001). A baixa sensibilidade do teste, entretanto, está diretamente ligada a qualidade dos reagentes utilizados, sobretudo, o antígeno. A utilização de antígeno homólogo para a detecção de anticorpos contra determinado vírus torna o teste mais sensível (Knowles et al., 1994; Abreu et al., 1998).

2.7.2 DOT ELISA

Técnica baseada na sensibilização de membranas de nitrocelulose com ag e posterior adição de um ac marcado com peroxidase, para ocorrência de reação e revelação com formação de cor. O princípio é semelhante ao ELISA, no entanto, não requer aparelhagem sofisticada (Pinheiro, 2001; Pinheiro et al., 2006). Apresenta, ainda, uma sensibilidade superior a IDGA e uma praticidade que o torna, nestes termos, mais vantajoso que o ELISA.

Existem vários trabalhos que fazem uso de Dot Blot para diagnóstico. Entre estes trabalhos pode-se citar o realizado por Georgieva et al. (2002), que utilizou esta metodologia para o diagnóstico do reovírus aviário. Segundo estes autores, o teste foi econômico, de fácil elaboração, sendo, ainda, sensível. Herbeling et al., (1987) realizaram um Dot-Immunobinding para diagnóstico do vírus da raiva, que, mais uma vez, mostrou, além das características supracitadas, a vantagem de utilizar ag viral inativado. Lin ; Halbert (1986) realizaram o Dot-ELISA para diagnóstico do citomegalovírus, no qual eles afirmaram que este é um teste flexível, podendo ser realizado com o número certo de membranas, equivalendo com o de amostras, evitando desperdícios. Além disso, o suporte do aparelho é feito de plástico hidrofóbico,

impedindo que as substâncias (ag, ac, tampões) possam extravasar de um poço para outro, provocando reações cruzadas. Estes autores relatam, ainda, perspectivas acerca do uso do Dot-ELISA para diagnóstico de vários microorganismos, ao mesmo tempo, utilizando o mesmo suporte.

Pode ser usado como método quantitativo, quando se deseja verificar a concentração do ag, ou, ainda, como qualitativo separando amostras em positivas ou negativas (Pinheiro, 2001).

No trabalho realizado por Herbeling et al. (1988), no qual se comparou o Dot Blot ao ELISA, registrou-se uma concordância de 93 % dos resultados. É sabido, porém, que a sensibilidade de ambos os testes é semelhante ao ELISA. Este dado foi confirmado por Pinheiro (2001), o qual utilizou o vírus completo na realização do Dot. Neste trabalho, Pinheiro obteve um grau de concordância de 90, 2 % ($p < 0,001$) entre o ELISA-i e o Dot Blot. Este autor utilizou o vírus completo para detecção de ac, contribuindo para superioridade com relação a IDGA e na semelhança com o ELISA, em termos de sensibilidade.

Segundo Herbeling ; Kalter (1986), existe uma necessidade constante por testes mais rápidos, sensíveis e específicos com fins diagnósticos. Ainda segundo estes autores, testes, como o ELISA, que requerem o uso de poliestireno ou outros materiais de baixa capacidade para detectar proteínas não são bons. Towbin et al. (1979), afirmam que o uso de nitrocelulose em técnicas como o *western blotting* apresentam uma melhor capacidade para detectar substrato.

A estabilidade que a membrana confere ao ag, após a aderência do mesmo, proporciona sua conservação por um período prolongado a temperatura ambiente, viabilizando o uso deste teste em campo (Herbeling ; Kalter, 1986).

Todas estas características foram comprovadas por Pinheiro (2001), que padronizou o *Dot-Blot* para o diagnóstico da CAEV.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente os pesquisadores procuram padronizar testes eficazes, rápidos e práticos para o diagnóstico das LVPR. A escolha do(s) método (s) diagnóstico (s) para as lentivirose é um aspecto relevante na medida em que uma das características desta doença é a soroconversão tardia. Testes sensíveis devem ser o de escolha para diagnóstico, já que resultados falso-negativos podem tornar os animais fonte de dispersão viral. No caso da Maedi-Visna, doença vinculada a ovinos, torna-se necessário desenvolver ou mesmo padronizar técnicas já existentes para diagnosticar o mais rápido e preciso possível à enfermidade, barrando a disseminação do vírus. As perdas econômicas são grandes, decorrentes de falhas reprodutivas, morte, diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais. Por isso o controle da doença é necessário, dependendo da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial (Dantas, 2004). A IDGA, teste amplamente utilizado apresenta-se como uma alternativa eficaz, na medida em que possui baixo custo e alta especificidade. Questiona-se, porém, que a baixa sensibilidade deste teste o torna eficaz apenas para aqueles animais que já estão soroconvertidos, com índices de ac elevados, sendo pois, ineficaz para aqueles que soroconvertem tardiamente, ou que possuem baixas quantidades de ac. Neste contexto, outros testes podem ser usados, como o ELISA, o *western blotting* e até mesmo, a PCR. O Dot-Blot é um teste já desenvolvido para diagnosticar patologias virais como reovírus aviário (Georgieva et al., 2002), HIV (Herbelling et al., 1988), bem como a Artrite Encefalite Caprina (Pinheiro, 2001; Pinheiro et al., 2006), no entanto, não se encontrou na literatura registros da utilização desta técnica para diagnóstico da Maedi Visna. Em virtude da alta sensibilidade, especificidade e um custo baixo (Pinheiro et al., 2006), torna-se interessante testá-lo para Maedi Visna.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

O Dot ELISA é um teste que apresenta uma sensibilidade e especificidade superior ao IDGA para o diagnóstico da MV.

5. OBJETIVOS GERAIS

Padronizar o teste *Dot-ELISA* para o diagnóstico sorológico da Maedi Visna

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir antígeno do vírus Maedi Visna para testes imunoenzimáticos;
2. Avaliar o perfil protéico e antigênico do antígeno do MVV;
3. Padronizar o teste Dot-ELISA para o diagnóstico do MVV;
4. Comparar o teste DE com IDGA em termos de sensibilidade, especificidade.

6. CAPÍTULO I

MAEDI-VISNA VÍRUS: PRODUÇÃO DE ANTÍGENO, ANÁLISE PROTÉICA E ANTIGÊNICA.

Maria Alzira do Carmo Aragão¹, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Alice Andrioli³, Francisco Selmo Fernandes Alves³, Andréa Alice da Fonseca Oliveira³, Maria Fátima da Silva Teixeira⁴

RESUMO

A Maedi-Visna é uma doença persistente, progressiva e debilitante em ovinos causada por lentivírus que resulta primariamente em pneumonia intersticial e pode estar associada a mamite e encefalite. Várias pesquisas apresentam distintas informações sobre as características morfológicas, imunológicas e genotípicas do Vírus da Maedi-Visna. Este trabalho teve como objetivo produzir antígeno a partir do vírus Maedi-Visna total para utilização em ensaios imunoenzimáticos. Na produção do antígeno foram utilizados cultivos primários de células de membrana sinovial caprina, infectados com amostra padrão (MVV-K1514). As suspensões virais foram tituladas e o antígeno semipurificado pela precipitação em PEG (polietilenoglicol) e ultracentrifugação. Para a avaliação do antígeno foram realizadas eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blotting* (WB) A SDS-PAGE de origem viral e do meio de cultivo resultou em várias bandas protéicas. No WB constatou-se a presença de sete proteínas imunogênicas de pesos moleculares aproximados de 16, 27, 35, 50, 42, 63 e 123 kDa. Destas, três proteínas (16, 27 e 50 kDa) apresentaram boa reação imunogênica. O trabalho abre perspectivas da utilização de testes imunoenzimáticos com maior sensibilidade para lentivírus ovino.

Palavras Chave: Lentivirose, Ovino, Diagnóstico, Proteínas.

¹ Bióloga, Mestranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - PPGCV/Universidade Estadual do Ceará. Laboratório de Virologia Avenida Paranjana, 1700 Campus do Itapery CEP 60740-00 Fortaleza – Ceará. E-mail: alzirac@hotmail.com.br.

² Méd. Veterinário, PhD, Pesquisador da Embrapa Caprinos e Prof. da Universidade Estadual Vale do Acaraú – Co-Orientador.

³ Médica(o) Veterinária(o), PhD, Pesquisador da Embrapa Caprinos.

⁴ Méd. Veterinária, PhD, Professora da Universidade Estadual do Ceará – Orientadora.

MAEDI-VISNA VIRUS: ANTIGEN PRODUCTION, PROTEIN AND ANTIGENIC ANALYSIS

SUMMARY

The Maedi-Visna is a gradual debilitating and persistent illness of sheep caused by lentivirus that results primarily in interstitial pneumonia. The main objective of this work was to produce antigen from the total Maedi-Visna virus for use in immunoenzymatic assays. In the production of the antigen had been used primary cells cultured from sheep sinovial membrane goat by "explant" followed of co-culture of the cells. The viral suspension used sample standard (MVV-K1514). For the evaluation of antigen were performed Eletroforesis in poliacrilamida gel of (SDS-PAGE), Western Blotting (WB) and Enzyme Linked Immunosorbent Assay had been carried through (ELISA). The SDS-PAGE of viral origin and the cultured medium resulted in some proteins bands. In the WB it was observed presence of seven immunogenic proteins of approximately molecular weights 88, 70, 56, 36, 27, 18 and 14 kDa. Three proteins (27, 36 and 56 kDa) had presented a good immunogenic reaction. The whole antigen produced also presented excellent result in the ELISA system. This work follows research perspectives in the use of immunoenzymatic tests with better sensitivity to lentivirus in sheep.

Key Words: Lentiviruses, Maedi-Visna, Diagnostic, Proteins.

INTRODUÇÃO

A Maedi-Visna é uma infecção persistente de ovinos, causada por lentivírus, resultando primariamente em pneumonia intersticial, podendo apresentar mamite e encefalite associadas. Segundo McGuire et al. (1990), existem várias cepas deste lentivírus diferindo na virulência e antigenicidade. Várias pesquisas demonstram a caracterização de antígenos dos lentivírus (Dahlberg et al. 1981; Davies et al. 1997).

Segundo Knowles (1997), diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para lentiviruses de pequenos ruminantes (LVPR), onde são empregados tanto antígenos nativos como recombinantes. Houwers et al. (1982) desenvolveram um ELISA para a detecção de anticorpos para o MVV com um antígeno parcialmente purificado, compararam com a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e o teste de fixação de complemento (FC), e verificaram que todas as amostras positivas na IDGA, FC ou ambas também foram positivas no ELISA. Houwers & Schaake (1987) utilizaram anticorpos monoclonais para p27 do MVV num ELISA sanduíche de bloqueio com dois anticorpos ("*double antibody sandwich blocking - DAS blocking*") e os resultados foram comparados com aqueles obtidos na IDGA e no ELISA-i. A nova técnica, denominada de CTB-ELISA, foi altamente específica e tão sensível quanto IDGA e ELISA-i.

A eficiência dos programas sanitários de controle da Lentivírus de pequenos ruminantes depende da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial, da frequência de sua utilização, no monitoramento sorológico das medidas implantadas e nos manejos utilizados no rebanho. Para realização periódica de testes sorológicos dos rebanhos, a técnica de IDGA é empregada mundialmente como método de triagem e monitoramento das fases iniciais de programas de controle, mas apesar da boa especificidade, a IDGA pode apresentar

resultados falso-negativos (Knowles, 1997). Testes sorológicos com maior sensibilidade devem ser utilizados quando ocorrer redução substancial da quantidade de animais soropositivos, testados por IDGA, e ainda, quando a taxa de soroconversão no rebanho, apesar de baixa, for mantida (Embrapa, 1996). Segundo Schroeder et al. (1985), a IDGA não é muito sensível além do tempo de estima para sua realização e leitura, principalmente em grande quantidade de amostras. Em decorrência deste aspecto, distintas modalidades de testes imunoenzimáticos têm sido desenvolvidas para a detecção de anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes, utilizando antígenos nativos ou recombinantes (Knowles, 1997). Este trabalho teve como objetivo produzir antígeno para ensaios imunoenzimáticos preparado a partir do vírus Maedi-Visna total e analisá-lo quanto ao perfil protéico e antigênico.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo de células

Para produção de suspensões e titulações do lentivírus ovino (LVO), foram utilizados cultivos primários de células de membrana sinovial caprina (MSC) obtida por “*explant*” a partir de cordeiro comprovadamente negativo para LVPR, seguido de sub-cultivos por tripsinização das células (Pinheiro, 2001), totalizando um número limitado a 17 passagens.

Vírus, titulação e suspensão viral

Na produção da suspensão viral utilizou-se amostra padrão do vírus da Maedi-Visna - Cepa K1514⁵ com título inicial de $10^{4,3}$ dose infectante em cultura de tecido/ml (TCID/mL). Monocamadas semiconfluentes (90 a 95% de confluência) de Membrana Sinovial Caprina (MSC) (11^a passagem) cultivadas em garrafas roller de 830 cm² de superfície de cultivo, foram inoculadas, 72 a 96 horas após passagem, com 15 mL de suspensão viral contendo 200 doses formadora de sincício (DFS)/mL diluída em meio essencial mínimo (MEM) sem soro fetal bovino (SFB). Após 60 minutos adicionaram-se 135 mL de MEM com 5% de SFB. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa (5 % de CO₂), sendo observadas diariamente para averiguar a evolução do processo. Coletou-se o sobrenadante semanalmente por três vezes ou até a destruição de 75% da monocamada. Os sobrenadantes coletados, bem como as garrafas contendo sobrenadante da última coleta foram congeladas a -80°C para posterior titulação e produção do antígeno. As suspensões virais foram tituladas em microplacas, por diluições decimais em MEM sem SFB, utilizando-se oito repetições por diluição. A cada 50µL da diluição da suspensão de células de MSC contendo $3,0 \times 10^4$ células/cm² foi adicionado 50µL de vírus. Foram mantidos poços com controle positivo (células de MSC e LVO) e negativo (células de MSC e MEM). As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 14 dias com observação diária do efeito citopático (ECP) característico. Após este período, a suspensão de células foi fixada em metanol e corada com cristal violeta a 0,1%. O título, calculado segundo Reed & Muench (1938), definido como a recíproca da maior diluição que apresentou, 14 dias após inoculação, sincícios em 50% dos poços inoculados, correspondendo a uma DFS (Castro, 1998).

Purificação do vírus e produção do antígeno

Na produção do antígeno, os sobrenadante das coletas iniciais e o conteúdo das garrafas mantidos congelados foram submetidos a dois ciclos de congelamento e descongelamento e então clarificados por centrifugação a 3300g em rotor Sorvall GSA a 4°C por 20 minutos. A suspensão clarificada foi precipitada com PEG-8000 a 40%, até a concentração final de 8%, por 18 h a 4°C, sob lenta agitação, seguida de nova centrifugação a 4°C a 12000g em rotor Sorvall GSA por 60 min (Reis & Leite, 1994). O sedimento foi ressuspensão em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0 mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral e ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 32500g por 120 min a 4°C (Houwens et al., 1982). O sedimento foi suspenso em PBS (0,05M; 1,5M NaCl; pH 7,4) contendo 0,20mM de phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) na proporção de 0,5% do volume inicial.

Dosagem de proteína, Eletroforese ,SDS-PAGE e Western Blotting (WB)

A concentração de proteína total foi determinada segundo Bradford (1976) e o antígeno mantido a -20°C até a realização dos ensaios laboratoriais. O antígeno purificado foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando mini-gel⁶ com 4 % de gel de concentração e 12 % de gel de separação, acompanhado com padrão broad-range (10 – 200 kDa)⁷ (Laemmi, 1970). O perfil eletroforético foi determinado nas amostras de antígeno diluídas em tampão de amostra (SDS 10%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,2%; 0,5M Tris-HCl, pH

⁵ Amostra viral oriunda do *Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants* – INRA – ENVL - France.

⁶ Mini-Protean II Cell® - Bio-Rad

⁷ Broad-range 10-200kDa Protein Ladder. Gibco

6,8) aquecendo a mistura a 100°C por 3 minutos. As proteínas do gel foram coradas usando azul de Comassie, segundo Harlon & Lane (1988).

No WB, as proteínas do antígeno, inicialmente separadas por SDS-PAGE, foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose⁸ (MN) através do trans-blot⁹ em tampão de transferência, por 60 minutos a 100 volts e 350 mA. Após a transferência para MN as proteínas foram bloqueadas com solução de bloqueio (PBS Tween 0,3%) por 60 minutos e lavadas com solução de lavagem (PBS Tween 0,05%) por três vezes, cinco minutos cada. O soro positivo do kit comercial¹⁰ para diagnóstico do Maedi-Visna foi diluído (1:50) adicionado as MN e incubado por 90 minutos a 37°C. Após a incubação as MN foram lavadas seguindo o mesmo processo citado anteriormente e foi colocado conjugado coelho anti-cabra peroxidase diluído (1:1500) em PBS, por 60 minutos. As MN foram novamente lavadas com PBS Tween 0,05% por três vezes, cinco minutos cada e com PBS, duas vezes, cinco minutos cada. A MN foi colocada em solução de DAB/4-Cloronaphthol (*solução A*- 12 mg de Diaminobenzidine¹¹ em 12mL de PBS, *solução B*- 5mg de 4-Cloronaphthol¹² adicionado a 2 mL de metanol mais 10 mL de PBS). Misturou-se as duas soluções e acrescentou 10µL de H₂O₂ a 30% por aproximadamente 15 minutos ao abrigo da luz. No final, a reação foi finalizada através da lavagem das MN com água destilada. Todas as etapas, com exceção da revelação, foram realizadas sob agitação.

⁸ Membrana de nitrocelulose Dura-blottm, com poro de 0,45µm.SIGMA.

⁹ Trans-blot ® - Bio-Rad

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

¹¹ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) - Sigma

¹² 4-Cloro-1-Naphtho - Sigma

RESULTADOS

A produção do antígeno do vírus total da Maedi-Visna resultou em volume de 2,0 mL apresentando a quantidade de proteína de 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em eletroforese (figura A) verificou-se várias bandas protéicas 10 μg nas canaletas. As proteínas tinham pesos moleculares variando de 16 kDa a 123 kDa.

No imunoblotting (figura B), quando utilizou-se uma quantidade de 10 μg na canaleta observou-se sete proteínas imunogênicas, com os pesos moleculares aproximados de 16, 27, 35, 50, 42, 63 e 123kDa. Entretanto, a banda de peso molecular aproximado de 16 kDa e 27 kDa foram as que apresentaram maior reação imunogênica, seguida pela proteína p50. As bandas de peso molecular de 35, 42, 63 e 123 kDa também apresentaram uma boa reação imunológica. Quando utilizou-se soro negativo não verificou-se bandas protéicas imunogênicas pela inexistência de ligações.

DISCUSSÃO

Na quadro 1 estão listadas várias proteínas antigênicas encontradas em alguns trabalhos para os Lentivírus de Pequenos Ruminantes.

Segundo Kwang & Cutlip (1992) a glicoproteína transmembrânica (gp44) e a proteína do capsídeo (p27) são os principais determinantes antigênicos dos lentivírus ovinos, o que corrobora em parte com os achados neste trabalho, pois neste verificou-se a presença da p27.

Torfason et al. (1992) numa revisão sobre polipeptídios em lentivírus ovino relataram que muitos trabalhos têm sido realizados para determinar o número de polipeptídios,

nomenclatura em termos de peso molecular e glicosilação dos polipeptídios. Salientam, ainda, que o número de polipeptídios reportados para o vírus Maedi-Visna maduro varia de 10 a 25. Neste trabalho descreve-se que os três gag polipeptídios dos lentivírus ovinos são p14, p16 (que pode ser designado como p15 ou p16), e a principal proteína do caprídeo p25 (designada como p25, p26, p27, p28 e p30). A banda de 35kDa é um precursor (Pr35), que de acordo com Sonigo et al. (1985) pode ser a gp39. A existência da gp44 (reportada como 44kDa, 45kDa ou 46kDa) é bem documentada. Tem sido relatadas a p50 ou gp51, tanto quanto o precursor Pr55 *gag*. A 70kDa tem sido reportado uma glicoproteína (gp70) como também um monômero da transcriptase reversa. A p80 e a gp90 (reportada como gp92) foram descritas (Hasse & Baringer, 1974; Cheevers et al., 1988). Um polipeptídeo fosforilado (gp90) pode possivelmente ser parte da transcriptase reversa. Relatam-se, também, a gp105 e a gp135 (descrita como gp115, gp140 ou gp145). Finalmente existem os precursores: Pr150 *gag-pol* (ou Pr175*gag-pol*) e o gPr150 *gag-pol* (ou gPr175 *gag-pol*). Fevereiro & Barros (2004), identificaram as proteínas relacionadas ao isolado P1OLV, tendo registrado a ocorrência da Pr55Gag, p16, p14, Pr160GagPol, p30, gp150, gp125 e gp 41. A proteína de peso molecular aproximado 123 kDa detectado pelo immunoblot neste trabalho está relacionada ao precursor Pr160GagPol. Com o lentivírus caprino (LVC) os relatos são semelhantes.

Dahlberg et al. (1981) estudando proteínas do vírus MVV e CAEV realizadas em eletroforese num mesmo gel encontraram perfis protéicos diferentes. As proteínas do MVV (MVV K1514) encontradas neste trabalho, na SDS-PAGE e immunoblot, foram relatadas na literatura. Torfason et al. (1992) relatam que alguns antígenos, especialmente as glicoproteínas, são sensíveis ao tratamento sofrido na purificação. Relatam também, que no início dos testes immunoblot e ELISA comerciais para o diagnóstico do lentivírus humano (HIV) os

Quadro 01. Polipeptídeos encontrados nos LVPR segundo vários autores.

| Autores (ano) | Vírus | Teste | Proteínas encontradas (kDa) |
|-----------------------------|-------------|--|--|
| Dahlberg et al. (1981) | CAEV MVV | Imunoprecipitação | CAEV – gp155, gp140, p63, p51, p28, p17, p14 MVV- gp155, gp135, gp105, p56, p46, p27, p15, p13,5 |
| Johnson et al. (1983) | CAEV | Imunoprecipitação <i>Immunoblot</i> | gp135, gp90, gp70, p46, p43, p28, gp15, p13 gp125, gp90, p45, p28, p15 |
| Gogolewski et al. (1985) | CAEV | Imunoprecipitação | gp135, gp92, gp70, gp45, p28, p19, p16, p14 |
| Cheevers et al. (1988) | CAEV | Imunoprecipitação | Pr150 ^{env} , gp 135, Pr90 ^{env} , Pr55 ^{gag} , Pr47 ^{gag} , 4 polipeptídios entre 30-47k, p28, p16 e p14 |
| Torfason et al. (1992) | MVV | <i>Immunoblot</i> | MVV-gp135, várias bandas (0-100kDa), p35, p25, p16, p14 |
| Hullinger et al. (1993) | CAEV | Imunoprecipitação | gp135, complexo 90, Pr46 ^{gag} , gp38, p14 |
| Davies et al. (1997) | CAEV | <i>Immunoblot</i> | gp135, gp90, p70, p56, gp45, p32, p19 |
| Pinheiro (2001) | CAEV | <i>Immunoblot</i> | p145, p48, p27, p19 |
| Varea (2001) | MVV | <i>Immunoblot</i> | p14, p17, p25, gp46 |

Quadro 1 - Polipeptídeos encontrados nos LVPR segundo vários autores.

glicopolipeptídeos eram pobremente expressados, provavelmente devido a perda destes durante a preparação. Ozyoruk et al. (2001) verificaram no immunoblot que anticorpos monoclonais reagiram com glicoproteína de superfície do vírus CAEV-63 seguidos de desnaturação somente na ausência de agente redutor, indicando que as pontes dissulfeto intramolecular foram essenciais para a integridade do epitopo.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA Caprinos e ao Banco do Nordeste, pelo suporte técnico-financeiro na execução de todo o delineamento experimental. e a Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa – FUNCAP pelo suporte financeiro na forma de bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.*, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C. The lentiviruses: MAEDI/VISNA, Caprine Arthritis-encephalitis and Equine Infectious Anemia. *Advances in Virus Research.*, v. 34, p. 189-215, 1988.

DAHLBERG, J. E., GASKIN, J. M., PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *Journal of Virology*, v. 39, n. 3, p. 914-919, 1981.

DAVIES, J.M., ROBINSON, W.F., CARNEGIE, P.R. Antibody reactivity to the transmembrane protein of the caprine arthritis encephalitis virus correlates with severity of arthritis: no evidence for the involvement of epitope mimicry. *Veterinary Immunology and Immunopathology.*, v. 60, p.131-147, 1997.

EMBRAPA. Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV-II) (subprojeto N° 06.0.94.102-01). Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos.1996, 110p

FEVEREIRO, M.T. & BARROS, S.S. Caracterização biológica e molecular de um lentivírus de ovino isolado em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária*, v. 99, p. 27-39, 2004.

GOGOLEWSKI, R.P., ADAMS, D.S., McGUIRE, T.C., BANKS, K.L., CHEEVERS, W.P. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *Journal of General Virology*, v. 66, p. 1233-1240, 1985.

HAASE, T.A., BARINGER, J.R. The structural polypeptides of RNA slow viruses. *Virology*, v. 57, p. 238-250, 1974.

HARLON, E., LANE, D. Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 865p.

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

HOUWERS, D.J., SCHAAKE, Jr. J. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. *J. Immunol. Methods*, v. 98, n.1, p.151-154, 1987.

HULLINGER, G. A., KNOWLES, D. P., McGUIRE, T. C., CHEEVERS, W. P. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology*, v. 192, n. 1, p. 328-331, 1993.

JOHNSON, G.C., BARBET, A.F., KLEVJER-ANDERSON, P., McGUIRE, T.C. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 2, p. 657-65, 1983.

KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary clinics of North America: food animal practice*, v. 13, p.1-11 , 1997.

KWANG, J., CUTLIP, R.C. Analysis of antibody response to ovine lentivirus by using viral gene products expressed in a prokaryotic system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 188, p. 20-27, 1992.

LAEMMI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p. 680-685, 1970.

McGUIRE, T. C., O'ROURKE, K. I., KNOWLES, D. P., CHEEVERS, W. A. Caprine arthritis encephalitis lentivirus transmission and disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology.*, n. 160, p. 61-75, 1990.

OZYORUK, F., CHEEVERS, W.P., HULLINGER, G.A., McGUIRE, T.C., HUTTON, M., KNOWLES, D.P. Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: Potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, n.1, p.44-51, 2001.

PINHEIRO, R. R. *Vírus da artrite encefalite caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará*. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2001.

REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.

REIS, J.K.P., LEITE, R.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v.20, p.261-267, 1994.

SCHROEDER, B. A., OLIVER, R. E., CATHCART, A. The development and evolution of end ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus in goat. *New Zealand Veterinary Journal* , v. 33, n. 12, p. 213-219, 1985.

SONIGO, P., ALIZON, M., STASKUS, K., KLATZMANN, D., COLE, S., DANOS, O., RETZEL, E., TIOLLAIS, P., HAASE, A., WAIN-HOBSON, S. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: relationship to the AIDS virus. *Cell*, v. 42 p. 369-382, 1985.

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

VAREA, R et al. R. Varea, E. Monleo'n, C. Pacheco, L. Lujá'n, R. Bolea, M. A. Vargas, G. Van Eynde, E. Saman, L. Dickson, G. Harkiss, B. Amorena, J. J. Badiola. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia)virus seroconversion in field sheep samples *J Vet Diagn Invest* v.13, p. 301–307, 2001.

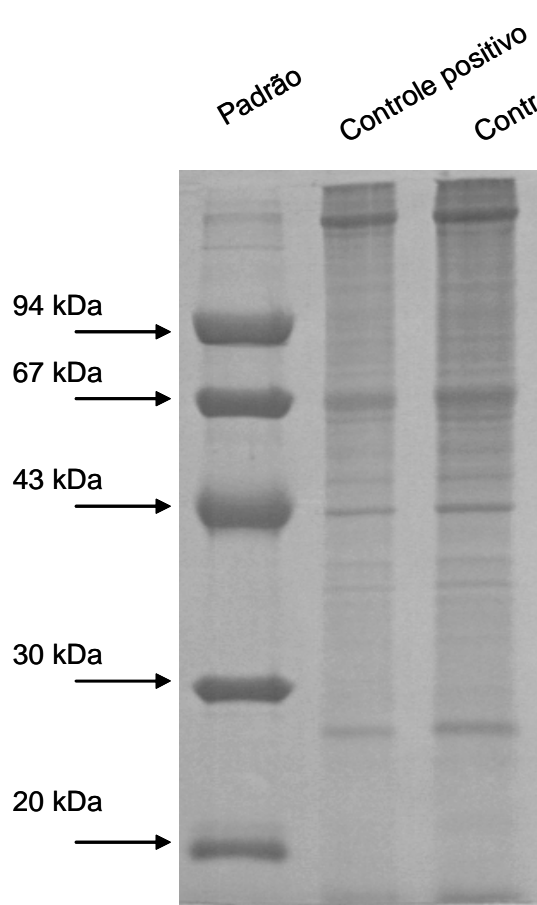


Fig A: Eletroforese de antígeno do vírus da Maedi-Visna cepa K1514.

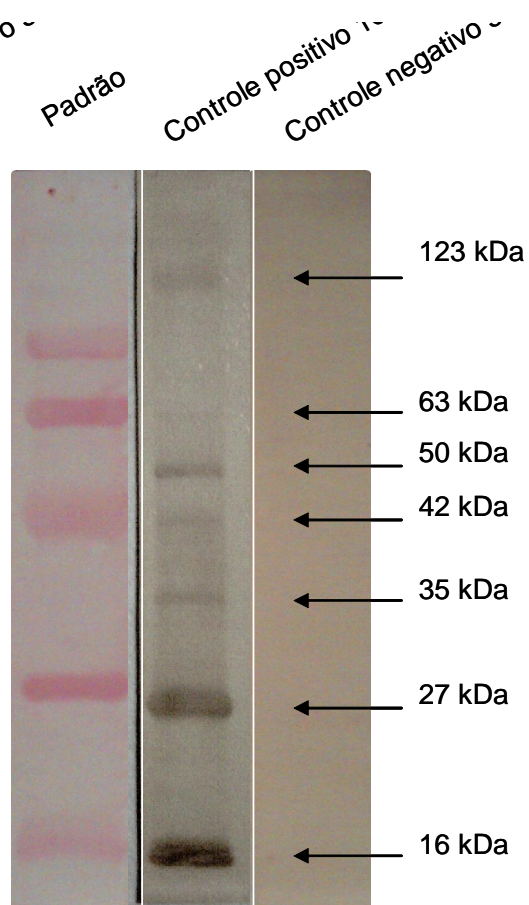


Figura B – Immunoblotting do antígeno do vírus da Maedi-Visna. Verificou-se a presença de sete bandas com reação imunogênica sendo as três mais reagentes de peso molecular aproximado de , 16, 27 e 50 KDa .

7. CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DO DOT-ELISA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA MAEDI-VISNA

Maria Alzira do Carmo Aragão¹³, Raymundo Rizaldo Pinheiro¹⁴, Ronaldo Pereira Dias¹⁵, Alice Andrioli Pinheiro¹⁶, Tânia Valeska Medeiros Dantas¹⁷, Maria Fátima da Silva Teixeira¹⁸

RESUMO

Atualmente para o diagnóstico dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes muitos testes são empregados, sendo que a IDGA é o teste padrão. Para o controle destas lentivirose, o diagnóstico inicial é de grande importância e, para tanto, a sensibilidade e especificidade do teste empregado são características relevantes. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o Dot ELISA (DE) frente à IDGA no diagnóstico da Maedi Visna. Inicialmente, produziu-se antígeno viral completo através do cultivo de células de membrana sinovial caprina, inoculadas com a cepa K1514 do vírus com um título $10^{4,2}$ TCDI₅₀/mL. Testes de padronização do DE foram realizados e mediante os resultados obtidos, utilizou-se como concentração ótima de antígeno 0,25 ug /poço. Avaliou-se 246 amostras de soro ovino e compararam-se os resultados a IDGA.

A sensibilidade do DE foi de 100 % e a especificidade 93,75% , sendo a concordância de 93,9%. Observou-se diferença significativa entre os resultados ($p < 0,05$). O DE é mais sensível que a IDGA e portanto, abre perspectivas para seu uso em testes de triagem, auxiliando nos processos de trânsito, comercialização de animais e no controle sanitário.

Palavras-chave: Maedi Visna, Dot-ELISA, IDGA, sensibilidade, especificidade.

¹³ Bióloga, Mestranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - PPPGCV/UECE. Avenida Paranjana, 1700 Campus do Itapery CEP 60740-00 Fortaleza – Ceará. E-mail: alzirac@hotmail.com.br.

¹⁴ Méd. Veterinário, PhD, Pesquisador da Embrapa Caprinos e Prof. da Universidade Estadual Vale do Acaraú – Co-Orientador.

¹⁵ Graduando em Biologia – Universidade Estadual Vale do Acaraú, IC – EMBRAPA Caprinos

¹⁶ Médica Vetrinária, PhD, Pesquisadora da EMBRAPA Caprinos

¹⁷ Médica Vetrinária ; Doutoranda - - PPPGCV/UECE

ABSTRACT

Currently for the diagnosis of Lentivírus of Small Ruminants many tests are employed, and that the IDGA, is the pattern. To control these lentiviroses, the initial diagnosis is of great importance, and to this, the sensitivity and specificity of the test are used features. With this, the objective of this study was to evaluate the Dot ELISA (DE) opposite the IDGA the diagnosis of Maedi visna. Initially, produced viral antigen is complete through the cultivation of cells of synovial membrane goats, inoculated with the strain K1514 virus with a title $10^{-4.2}$ TCID₅₀/mL. Tests were performed for the standardization and on the results obtained, used as optimum concentration of antigen 0.25 ug / well. Evaluated is 246 samples from sheep serum and the results are compared to IDGA. The sensitivity of the DE was 100% and specificity 93, 75%, with the concurrence of 93.9%. There was significant difference between the results ($p < 0.05$). The DE is more sensitive to the IDGA and therefore opens up prospects for its use in tests for screening, helping in the process of transit, and the marketing of animal health control.

Keywords: Maedi visna, Dot-ELISA, IDGA, sensitivity, specificity

¹⁸ Méd. Veterinária, PhD, Professora da Universidade Estadual do Ceará – Orientadora.

INTRODUÇÃO

Os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) determinam, geralmente, doenças degenerativas de progressão lenta. Fazem parte deste gênero o Vírus Maedi Visna (MVV) e o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), que acometem ovinos e caprinos, respectivamente, registrando-se, ainda, a infecção cruzada (Pisoni et al., 2005). Estes vírus estão distribuídos mundialmente (Pasick, 1998), exceto Austrália e Nova Zelândia, no caso da Maedi Visna (OIE, 2005).

O ciclo de vida dos LVPR está diretamente relacionado a maturação dos monócitos, em virtude da ativação de fatores específicos nos macrófagos, assim, os monócitos infectados circulam livremente até se fixarem nos tecidos, onde maturam, sem serem identificados pelo sistema imune, num mecanismo denominado “cavalo de Tróia” (Borderías, 2004).

Tanto a resposta humoral, como a celular podem ser ativadas pela infecção (Bruland, 2003), tendo ação estimuladora ou bloqueadora no desenvolvimento do ciclo viral.

Os cuidados advindos da necessidade de se controlar, ou mesmo erradicar, a LVPR são decorrentes, principalmente, dos efeitos econômicos. Num mercado cada vez mais exigente quanto a critérios sanitários, em se tratando do comércio de animais e, por consequência, de seus produtos, torna-se importante efetuar um controle eficiente destas enfermidades. Dois dos maiores entraves no rastreamento dos animais infectados por LVPR são a soroconversão tardia e a latência das manifestações clínicas, o que torna inviável a realização de um diagnóstico exclusivamente clínico.

Entre os testes sorológicos, os mais comumente utilizados são a IDGA (Imunodifusão em Gel de Agarose) e o ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (OIE,2005). A IDGA é o

teste mais usado para o diagnóstico das LVPR, sendo este recomendado pela OIE para uso em programas de erradicação. No entanto, em se tratando de MV, é sabido a utilização de muitas técnicas, para a identificação do vírus, entre as quais incluem-se: isolamento viral (Brodie et al., 1995), PCR (Brodie et al., 1995; Leginagoikoa et al., 2006), ELISA (Houwers et al., 1982; Howers & Schaake, 1987; Brodie et al., 1995; Pinheiro, 2001; Hermann et al., 2003ab; Dantas, 2004; Leginagoikoa et al., 2006), IDGA (Knowles et al., 1994; Abreu, 1996; Abreu et al., 1998; Pinheiro, 2001; Lara et al., 2002; Reischak et al., 2002a; Araújo et al., 2004; Dantas, 2004), imunofluorescência indireta (Reishack et al., 2004; Lara et al., 2002), imunohistoquímica (Brodie et al., 1995; Preziuso et al., 2004), hibridização *in situ* (Brodie et al., 1995; Preziuso et al., 2004), fixação do complemento (Houwers et al., 1982) e histopatologia (Brodie et al., 1995).

Para a escolha do teste diagnóstico duas características devem ser observadas: sensibilidade e especificidade. Além destas características, atualmente alia-se um interesse cada vez maior na elaboração de testes rápidos, práticos e de baixo custo.

Objetivando-se o efetivo controle da MV torna-se, portanto, necessário desenvolver ou mesmo padronizar técnicas já existentes para diagnosticar o mais rápido e preciso possível a enfermidade, barrando a disseminação desta. Um teste que possa reunir estes aspectos é de suma importância na eficácia do diagnóstico e programas de controle e erradicação das LVPR.

A IDGA é um teste simples, sobretudo pelo baixo custo, mas que no entanto já tem sido questionado pela baixa sensibilidade o que o torna eficaz apenas para aqueles animais que já estão soroconvertidos com índices de anticorpos elevados, sendo pois, ineficaz para aqueles que soroconvertem tardiamente, ou que possuem baixas quantidades de anticorpos.

O Dot-Blot é um teste já desenvolvido para diagnosticar patologias virais como reovírus aviário (Georgieva et al., 2002), HIV (Herbelling et al., 1988), bem como a Artrite

Encefalite Caprina (Pinheiro, 2001; Pinheiro et al., 2006), no entanto, não se encontrou na literatura registros da utilização desta técnica para diagnóstico da Maedi Visna. Em virtude da alta sensibilidade, especificidade e um custo baixo (Pinheiro et al., 2006), torna-se interessante testá-lo para Maedi Visna. O objetivo deste trabalho foi padronizar o Dot-ELISA para o diagnóstico do MVV, comparando os resultados obtidos com o teste padrão da OIE (IDGA).

MATERIAL E MÉTODOS

Produção de antígeno

O vírus MV (cepa K1514) foi cultivado em células de membrana sinovial caprina (MSC) em meio essencial mínimo (MEM) com 5 % de soro fetal bovino (SFB), 10 % de gentamicina e 1 % de anfotericina B. A cultura inoculada com o vírus foi acompanhada durante 21 dias e as coletas dos sobrenadantes realizadas a intervalos de sete dias. O material foi clarificado por centrifugação a 3300g em rotor Sorvall GSA a 4°C por 20 minutos. Posteriormente, foi tratado com 8 % de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) a 40 % durante 18 horas a 4 °C e peletizado por centrifugação a 4°C a 12000g em rotor Sorvall GSA por 60 min (Reis & Leite, 1994). Nesta etapa o sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em TNE (10,0 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10,0 mM NaCl; 1,0 mM EDTA) e centrifugado a 42500 g em colchão de sacarose em rotor Beckman SW41TI a 4 °C por duas horas (Houwers et al., 1982). Finalmente o pellet foi ressuspendido em PBS (0,05M; 1,5M NaCl; pH 7,4) e 10 % (do volume inicial) de

phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). O antígeno foi submetido a dosagem de proteínas pelo método Bradford (1976) e imunoblotting, tendo sido verificada a presença de sete bandas protéicas (16, 27, 35, 50, 42, 63 e 123 kDa) imunogênicas (dados não publicados). Como controle utilizou-se sobrenadante não inoculado e processado da mesma forma que o antígeno.

Padronização do Dot-ELISA

A dosagem de proteínas revelou uma concentração de 2,5 µg/ µl. A partir deste valor, realizou-se uma titulação do antígeno como forma de verificar a menor concentração capaz de promover a reação. Membranas de nitrocelulose¹⁹ foram colocadas no aparelho de dot²⁰ e sensibilizadas com antígeno diluído em PBS (Na₂HPO₄ 0,5 M; NaH₂PO₄ 0,5 M; NaCl; pH 7,4) nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0 e 2 µg/ poço e secas durante dez minutos com jato de ar quente. Cada concentração foi feita em quadruplicata com duas réplicas para cada concentração. Após devidamente secas, foram, então, coradas com corante Ponceau's e numeradas. A partir desta etapa foram divididas em dois grupos e submetidas a dois tipos de bloqueio. Grupo A, bloqueado com TTBS (Tris 20 mM; NaCl 500 mM, Tween 20 0,05 %, pH7,5) (Georgieva, 2002) por 15 minutos e grupo B bloqueado com PBS-Tween 0,3 % por 40 minutos. Passados os respectivos tempos, as membranas foram lavadas duas vezes por dois minutos sob agitação lenta com PBS-Tween 0,05 % e submetidas a duas diluições distintas (1:25 e 1:50) do soro positivo e soro negativo (ambos do kit comercial²¹) durante 30 minutos. Numa etapa seguinte, as membranas

¹⁹ Membrana de nitrocelulose SIGMA Dura-blot™, com poro de 0,45µm. Cat. Nº N 9641

²⁰ Minifold™ SRC-96 Marca: Schleicher & Schuell, INC. Keene, N.H.

foram novamente lavadas e incubadas com conjugado²² em duas diluições (1:10000 e 1:15000) durante 30 minutos. Passado este período, as membranas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05 %, duas com PBS e reveladas com 4 cloronaftol²³ e diaminobenzidina (DAB)²⁴. A reação ocorreu em um minuto e a reação foi parada com água destilada. Considerou-se como melhor resultado para efeito da padronização, a maior diluição do antígeno que apresentou melhor diferenciação visual de cor entre o soro positivo e o negativo. A partir deste resultado inicial, realizou-se um novo teste, no qual se avaliou o desempenho do fraco positivo (do kit americano), testando-se, ainda, as diluições de conjugado 1:10000, 1:15000 e 1:20000. Todas as etapas foram realizadas em estufa a 37 °C sob agitação constante.

IDGA

A metodologia utilizada foi a técnica de micro IDGA (MIDGA), padronizada por Gouveia (1994). Utilizando-se o kit comercial²⁵.

Amostras

Como universo amostral utilizou-se 246 amostras de sangue de ovinos provenientes de rebanhos do estado do Ceará. O sangue foi coletado em tubos Vacutainer, sem anticoagulante. Após a coleta, as amostras sanguíneas foram encaminhadas ao laboratório de virologia da EMBRAPA Caprinos, onde foram centrifugados a 3000 g por 10 minutos. Os soros foram, então identificados, armazenados em criotubos e conservados em freezer -20 °C, até a realização das

²¹ *Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®*, USA.

²² Anti-goat IgG peroxidase conjugate – Sigma Cat. N° A5420

²³ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) – Sigma. Cat. N° D 5637

²⁴ 4-Cloro-1-Naphto – Sigma. Cat. N° C 8890

²⁵ Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc®, USA.

análises. Todos os testes foram submetidos a dois avaliadores em momentos distintos.

Análise Estatística

Para efeito de cálculo da sensibilidade e especificidade do Dot ELISA, utilizou-se como teste padrão para comparação a IDGA (recomendado pela OIE). Os resultados dos testes analisados quanto a sensibilidade, especificidade, VPP (Valor Preditivo Positivo), VPN (Valor Preditivo Negativo) e Índice Kappa, utilizado o programa Winepsicope 1.0.

RESULTADOS

Padronização do Dot ELISA

Para o antígeno, todas as concentrações testadas reagiram especificamente com as diluições do soro utilizadas, revelando a possibilidade de utilização de qualquer título estudado para uso eficiente na execução dos testes. Entretanto, a concentração ótima considerada para efeito de padronização foi a de 0,25 ug/ poço de proteína viral. A melhor diluição do conjugado foi de 1:15000, a qual apresentou melhor distinção visual entre os soros controles positivo e negativo. Ambos os bloqueios tiveram o mesmo desempenho, tendo sido o bloqueio com TTBS o preferido em virtude de requerer, apenas 15 minutos de ação.

O valor de diluição ótima dos soros empregados na realização dos testes foi de 1:50, entretanto, o Dot foi capaz de detectar as variadas diluições utilizadas (1:25; 1:50) (ver figs. 01 e 02).

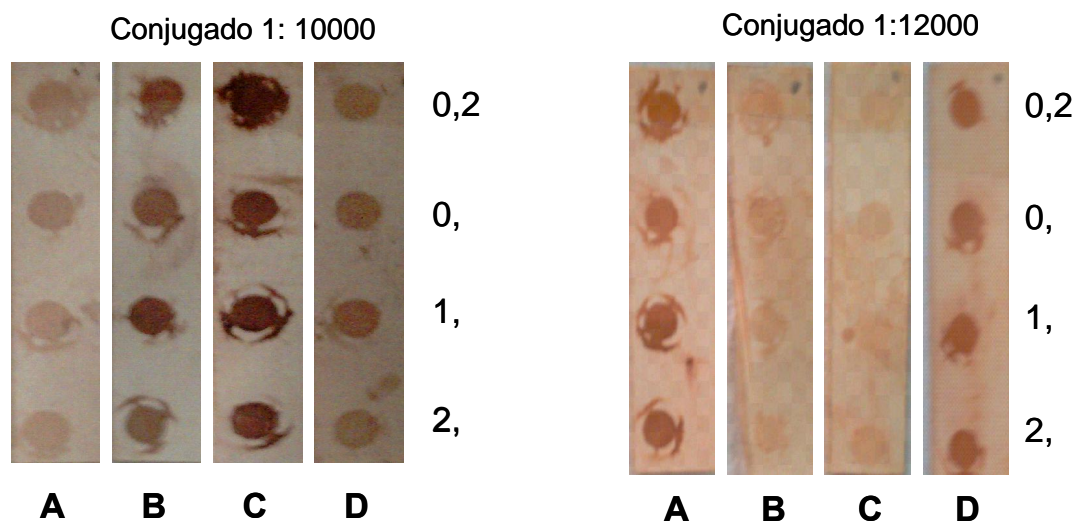


Fig. 01. Resultado das padronizações realizadas. Na vertical encontram-se as diluições de antígeno. Na horizontal encontram-se as diluições do soro, onde A= 1:25+; B= 1:25-; C= 1: 50+; D= 1:50-. Bloqueio utilizado: PBS 0,03 %.

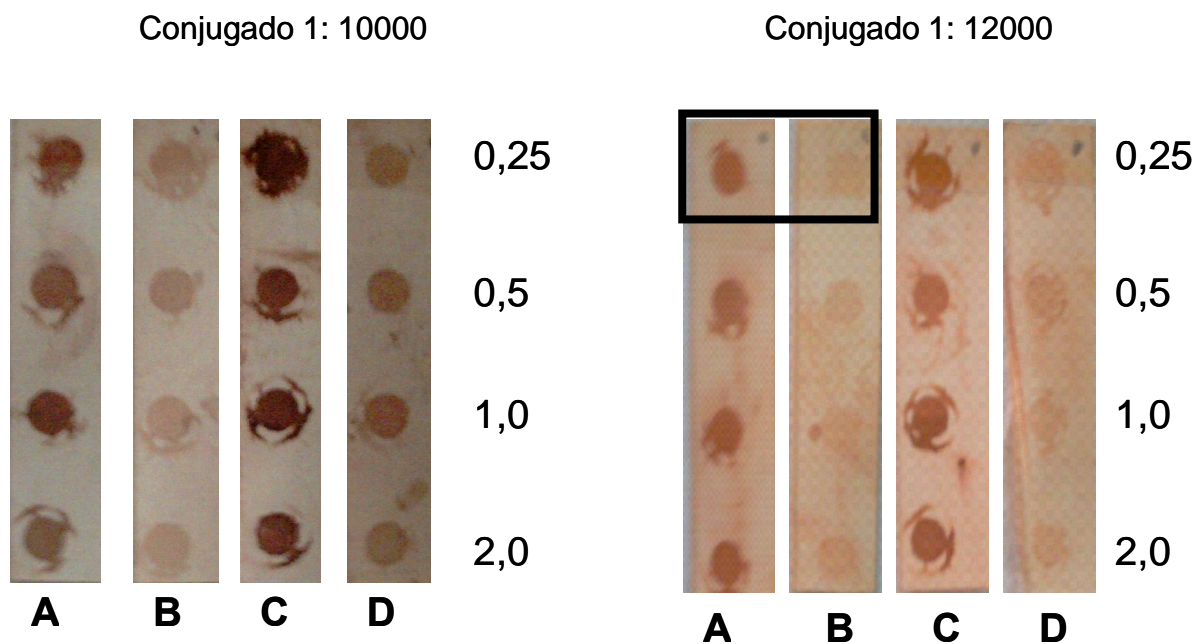


Fig. 02. Resultado das padronizações realizadas. Na vertical encontram-se as diluições de antígeno. Na horizontal encontram-se as diluições do soro, onde A= 1:50+; B= 1: 50-; C= 1: 25+; D= 1:25-. Bloqueio utilizado: TTBS. A área marcada corresponde a diluição ótima de antígeno e soro.

Durante a análise dos 246 testes, foi possível verificar uma distinção precisa entre os soros positivo e negativo. Devido a utilização de controles positivos e negativos, o poço considerado positivo foi o que mais visualmente se distinguiu do padrão negativo.

Comparação do Dot ELISA com a IDGA

Os resultados da comparação dos testes são apresentados na tabela 01. Dos 246 soros analisados, 21 do total foram positivos ao Dot ELISA. O VPP do teste foi de 28,5 %, enquanto o VPN foi de 100 %, sendo que a sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, 100 % e 93,75 %. A IDGA detectou a presença de anticorpos para o MVV em apenas seis das amostras analisadas (2,4 %). A concordância observada entre os resultados foi de 93,9 %.

Com relação a execução dos testes, verificou-se que ambos são de fácil realização, entretanto o tempo utilizado até a revelação dos resultados foi bem distinto. A IDGA requereu 48 a 72 horas para a leitura, já o Dot ELISA precisou de, apenas, 1,5 horas entre a realização do teste e leitura, que neste caso é imediata. Ainda com relação a execução do teste, foi observado que ambos não requerem instrumentação cara para sua realização.

O controle feito com o sobrenadante de células não inoculado e concentrado 500 vezes não revelou qualquer reação em nenhum dos testes (dados não apresentados).

TABELA 01: Resultados obtidos no teste dos soros pelo Dot ELISA e IDGA*

| Resultados | | |
|------------|------|------------|
| Dot ELISA | IDGA | No. (%) |
| + | + | 6 (2,4) |
| - | - | 225 (91,4) |
| + | - | 15 (6,09) |
| - | + | 0 |

*Concordância 93,9 %

DISCUSSÃO

O DE foi mais sensível que a IDGA ($p < 0,05$) IDGA. Tal resultado pode ser explicado tanto pelo aspecto metodológico, pela utilização de membranas de nitrocelulose como suporte de fixação do antígeno viral, como, também, pelo tipo de antígeno empregado na realização dos testes.

A IDGA, apesar de ser um teste amplamente utilizado, apresenta como desvantagem o fato de possuir baixa sensibilidade. Tal característica se deve, sobretudo, ao tipo de antígeno utilizado. O kit diagnóstico usado neste trabalho possui como proteínas antigênicas a p27 e a gp135 dos vírus da CAE e OPPV provenientes da América do Norte. A utilização deste antígeno, leva em consideração o fato de que as proteínas do capsídeo viral apresentam regiões conservadas para ambos os vírus (CAE e OPP) garantindo assim que mesmo com a presença de outra glicoproteína (gp135) variável seja possível detectar os anticorpos através de reconhecimento cruzado, através das regiões conservadas existentes (Grego et al., 2002). A

proteína p27 estimula uma forte produção de anticorpos (Brodie et al., 1998). Estas proteínas são específicas aos vírus relacionados, portanto apresentam alguma distinção entre as diversas cepas existentes. Reischak et al. (2002b) verificaram a necessidade de se produzir antígenos virais a partir de cepas nacionais e seus soros padrões, já que segundo os autores haveria a possibilidade de serem detectados maior quantidade de animais positivos, evitando a problemática dos resultados falso-negativos.

Outro aspecto a ser focado é o fato dos animais infectados sofrerem alternância nas reações imunogênicas, variando de acordo com o estágio da infecção. Os animais que tiveram seus soros analisados, não possuíam sinais clínicos da doença, e não se sabia a partir de quando estes animais haviam sido infectados e, conseqüentemente, o estágio da infecção. Lacerenza et al. (2006) verificaram que ovinos infectados dirigem sua produção de anticorpos a diferentes epítomos. Ainda em 2006, Mordasini e colaboradores observaram haver uma relação direta entre a dose infectante e a soroconversão, sendo que os animais naturalmente infectados apresentam baixos níveis de anticorpos e lenta soroconversão. Além disto, ovinos infectados a mais tempo, tem a capacidade de produzir quantidades de anticorpos que favorecem a sua detecção (Leginagoikoa et al., 2006).

O DE já é um teste bastante utilizado para o diagnóstico de diversas enfermidades. O princípio utilizado é bastante semelhante ao ELISA indireto, diferindo-se, apenas pela utilização de membranas de nitrocelulose, produzindo reações enzimáticas antígeno – anticorpo (Hibi & Saito, 1985). É um teste bastante simples, sendo de fácil execução. Ao contrário da IDGA, o tempo de execução deste teste é bastante curto, levando cerca de uma hora e meia entre a execução e a revelação dos resultados, porém, a IDGA, requer a subjetividade de um analisador.

Mais uma vez sobrevém a importância de um antígeno para realização dos testes.

Neste trabalho, o Dot padronizado, fez uso do antígeno viral completo, sendo que a gp135 estava em baixos níveis no antígeno final após ultra-centrifugação. Isto ocorreu em virtude da concentração ter sido feita em colchão de sacarose, a qual retirou grande parte da gp no momento da ultra-centrifugação (Pinheiro et al., 2006). A utilização do vírus completo permite uma maior detecção dos animais positivos visto que possui uma maior quantidade de proteínas distintas, contornando a problemática da variação dos tipos de anticorpos durante a infecção. Esta constatação já foi verificada por outros autores. Naeen & Goyal (1990) analisando o uso de antígeno cru (sem a separação de proteínas específicas) para detecção do herpes vírus bovino, afirmaram que num processo de purificação, a especificidade do teste é garantida, entretanto a sensibilidade é comprometida pela falha na detecção de anticorpos contra outras proteínas não presentes no material purificado. Varea et al., (2001) através do acompanhamento pelo ELISA, verificaram que animais infectados apresentam diferentes níveis de anticorpos ao longo da vida, relacionando, na ocasião, que o aumento da sensibilidade do teste estava diretamente ligado aos títulos dos anticorpos específicos.

Com o resultado do diagnóstico em 1,5 horas o DE padronizado na EMBRAPA Caprinos é o teste mais rápido para o diagnóstico da Maedi Visna, corroborando com Sulimenko; Dráber (2004) verificaram que utilização da membrana de nitrocelulose para a imobilização das proteínas antigênicas permite uma realização rápida dos testes.

É de grande importância atualmente, a elaboração de técnicas que possam ser mais práticas, não onerosas e que apresentem bons resultados. Tais características já foram verificadas por outros autores (Naeen & Goyal, 1990; Georgieva et al., 2002; Lin & Halbert, 1986; Madhusudana et al., 2004; Sumi et al., 1999; Sulimenko & Dráber, 2004; Pinheiro, 2001) É neste contexto que se insere o DE, revelando-se como uma alternativa a problemática sanitária

que envolve os processos de trânsito e comercialização dos animais.

Frente aos resultados, o DE, por ser um teste mais sensível e rápido, surge como alternativa a um diagnóstico da MV.

AGRADECIMENTOS

A EMBRAPA Caprinos e ao Banco do Nordeste, pelo suporte técnico-financeiro na execução de todo o delineamento experimental. e a Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa – FUNCAP pelo suporte financeiro na forma de bolsa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Silvio Romero. Isolamento de um vírus sincicial caprino (amostra RPE-03) e comparação da sensibilidade e especificidade relativas do antígeno Maedi-Visna frente ao antígeno AEC (amostra Cork) em teste de IDGA. 1996. 45f. Dissertação (Mestrado, Clínica Médica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.

ABREU, S.R. et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. Pesquisa Veterinária Brasileira. v.18, n.2, p.57-60, 1998.

ARAÚJO, S. A.C. et al. Levantamento sorológico da Maedi Visna em ovinos de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA; A MEDICINA VETERINÁRIA NO NOVO MILÊNIO: TRANSFORMAÇÃO SOCIAL, PRESERVAÇÃO AMBIENTAL E SEGURANÇA ALIMENTAR (31.: 2004: São Luís). Anais. São Luís: SBMV, 2004. CD-ROM.

ARAÚJO, S.A.C. et al. Identificação do Maedi-Visna vírus em pulmão de ovinos infectados naturalmente Arquivos do Instituto Biológico, v. 71 n.4, p. 431-436, 2004.

ASSIS, A. P. M. V. & GOUVEIA, A. M. G. Evidências sorológica de lentivírus (Maedi Visna/ artrite encefalite caprina) em rebanhos nos estados de MG, RJ, BA, CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA.

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

BRADFORD, M.. A rapid and sensitive method for microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 245 -248, 1976.

BRODIE, S.J. et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v.146, p.250--263, 1995.

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, p. 1-17, 1998.

BRULAND, T. **Studies of early retrovirus-host interactions, 2003.** 96f. Tese- Norwegian University of Science and Technology, Norwegian, 2003.

DANTAS, Tânia Valeska Medeiros Dantas. **Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de MAEDI-VISNA VÍRUS de ovinos.** 2004, 78f. Dissertação (Mestrado em Reprodução e sanidade em pequenos ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

De La CONCHA-BERMEJILLO, et al. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**., v. 57, p. 684-688, 1996.

GEORGIEVA, M. et al. (2002) A Dot-immunobinding assay to detect antibodies against avian reoviruses. **Experimental pathology and parasitology**., V. 518, P.35-38, 2002.

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.

GREGO et al. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-based immunoassay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.4, p. 828-832, 2002.

HERBELLING, R.L. et al. Dot-immunobinding assay compared with enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and specific detection of retroviruses antibody induced by human or simian acquired immunodeficiency syndrome **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, P. 765-767, 1988.

HERMANN, L.M. et al. Comparative inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.2, p. 267-271, 2003b.

HERRMANN, L. M. et al. Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 862-865, 2003a.

HIBI, T. & Saito, Y. A Dot immunobinding assay for the detection of Tobacco Mosaic Virus in infected tissues. **Journal of General Virology**, V. 66, P. 1191-1194, 1985.

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

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

KNOWLES, D.P., et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.

LACERENZA, D. et al. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 264-271, 2006.

LARA, M.C.C.S.H. et al. Identificação imunoserológica de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos: comparação das técnicas de imunodifusão em gel de agar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n. 4, p. 1-4, 2002.

LEGINAGOIKOA, I. et al. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. **Research Veterinary Science**, v. 80, p. 235-241, 2006.

LIN, T. & HALBERT, S.R.P. Rapid Dot enzyme immunoassay for the detection of antibodies to cytomegalovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n.1, p.7-11, 1986.

MADHUSUDANA, S. N. et al. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by dot blot enzyme immunoassay. **International Journal of Infectious Disease**, v.8, p. 339-345, 2004.

MORDASINI et al. Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 981-991, 2006.

NAEEN, K. & Goyal, M. S. A dot immunobinding assay on nitrocellulose for the detection of bovid herpesvirus-antibodies. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p.107-110, 1990.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. *Código sanitário para los animales terrestres* (2005). Disponível em: <http://www.oie.int/eng/OIE/organization/em_LR.htm> Acesso em: 15.05. 2006.

PASICK, J. Maedi-Visna vírus and Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus: Distinct species or *quasispecies* and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.

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

PINHEIRO et al. Desenvolvimento de *dot-blot* para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p. 51-56, 2006.

PINHEIRO, R. R. et al. Custo dos antígenos no diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, p. 110-113, 2006

PISONI, G. et al. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 147-152, 2005.

PREZIUSO, S. et al. Colostral transmission of maedi visna: sites of viral entry in lambs born from experimentally infected ewes. **Veterinary Microbiology**, 104, 157-164, 2004.

REIS, J.K.P. & LEITE, R.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. **Prev. Vet.. Méd**, v.20, p.261-267, 1994.

REISCHAK, D. et al. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n., p. 7-12, 2002a.

REISCHAK, D et al. Importância da escolha dos reagentes para o diagnóstico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 8, n. 2, p. 51-56, 2002b.

SULIMENKO, T. & DRABER, P. A fast and simple dot-immunobinding assay for quantification of mouse immunoglobulins in hybridoma culture supernatants. **Journal of Immunological Methods**, v.289, p. 89-95, 2004.

SUMI, M.G. et al. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by Dot Immunobinding Assay to detect mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 3925-3927, 1999.

VAREA, R. et al. Early detection of Maedi Visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 301-307, 2001.

8. CONCLUSÕES

1. O DE é mais sensível e rápido que a IDGA para o diagnóstico sorológico da MV.
2. O DE é um teste recomendado para o diagnóstico da MV.
3. O uso do antígeno viral completo é uma alternativa na resolução da problemática da variação dos títulos de anticorpos.
4. A utilização de antígeno viral completo oferece uma maior diversidade de proteínas imunogênicas, amplificando a capacidade de detecção de anticorpos.

9. PERSPECTIVAS

1. A rapidez demonstrada na execução do DE permitirá a utilização do teste para diagnóstico imediato da MV em ovinos participantes de exposições.
2. Suas características poderão ser ainda mais aprimorado, tornando o teste definitivamente independente de estrutura laboratorial e realizado em menor tempo, mediante algumas adaptações.
3. Uma total independência laboratorial permitirá realização de um diagnóstico dinâmico, podendo ser realizados inquéritos sorológicos mais precisos e rápidos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. **Isolamento de um vírus sincicial caprino (amostra RPE-03) e comparação da sensibilidade e especificidade relativas do antígeno Maedi-Visna frente ao antígeno AEC (amostra Cork) em teste de IDGA.** 1996. 45f. Dissertação (Mestrado, Clínica Médica) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1996.

ABREU, S.R. et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v.18, n.2, p.57-60, 1998.

AFSHAR, A., et al. Cytokine production in vitro by macrophages of goats with caprine arthritis-encephalitis. **Cellular and molecular biology.**, v.43, n.7, p.1031-1037, 1992.

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

ALMEIDA, N.C. et al. Detecção de ovinos soropositivos para maedi/visna destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. **Vet. Not.** ,Uberlândia, v. 9, n. 1, p.59-63, 2003.

ALMEIDA, N.C. et al. Isolamento do maedi visna vírus (MVV) de um ovino naturalmente infectado. **Ciência Aniamal** v11, n.2, p.86-88, 2001.

ÁLVAREZ, V. et al. PCR detection of colostrums-associated Maedi-Visna (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 226-234, 2006.

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

ANDRÉS. D. et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 49-62, 2005.

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

ANDRIOLI, A. et al. Parâmetros de fertilidade em caprinos infectados pelo Lentivírus caprino. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2002, Gramado: SVRS, 2002

ARAÚJO, S.A.C. et al. Identificação do Maedi-Visna Virus em pulmão de ovinos infectados naturalmente. **Arquivos do Instituto Biológico**. V.71, p. 431-436, 2004.

ASSIS, A. P.M. V. ; GOUVEIA, A. M. G. Evidência sorológica de (Maedi Visna/Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos Estados de MG, RJ, BA, CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINÁRIA, 23., 1994, Olinda; **Anais...** Olinda: SPMV, 1994. p.104.

AYELET, G. et al. Survey of Maedi Visna (MV) in Ethiopian Highland Sheep. **The Veterinary Journal**. v. 161, p. 208-210, 2001.

BIRD, P. et al. Early events in immune evasion by the lentivirus Maedi-Visna occurring within infected lymphoid tissue. **Journal of Virology**, v. 67, p. 5187-5197, 1993.

BLACKLAWS,B.A. et al. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v.101, p.199-208, 2004.

BOCTOR,F.N., et al. Dot-Elisa for serodiagnosis of human infections due to Western Equine Encephalitis virus. **Journal of Immunology Methods**, v.16, n.3, p.589-592, 1989.

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

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantiation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANCH, S.L.; LEVET.T, P.N. Evaluation of four met.hods for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**,v.6, n.4, p.555-557, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 87, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2004a. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10454>> Acessado em 10.12.2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria Nº 103, DE 07 DE DEZEMBRO DE 2004b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10453>> Acessado em 10.12.2007.

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, p. 1-17, 1998.

BRODIE, S.J. et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v.146, p.250--263, 1995.

BRODIE, S. J. S. **Studies on the immunopathogenesis, pathology, and diagnosis of lentivirus infection**. 1992. 195f. Tese (doutorado em microbiologia)- Universidade do Estado do Colorado, Fort Collins, 1992.

BRULAND, T. **Studies of early retrovirus-host interactions, 2003**. 96f. Tese- Universidade de Ciência e Tecnologia da Noruega, Noruega, 2003.

CALLADO, A. K. C et al. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e MAEDI-VISNA): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, p. 1-25, 2001.

CASTRO, R. S. ; MELO, L.E.H. CAEV e Maedi Visna: importância na saúde e produtividade de caprinos e ovinos e a necessidade de seu controle no Nordeste brasileiro. **Ciência Animal nos Trópicos**, v.4, p.315-320, 2001.

CASTRO, R.S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. 1998. 132f. Tese - (doutorado em medicina veterinária preventiva e epidemiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C. The lentiviruses: MAEDI/VISNA, Caprine Arthritis-encephalitis and Equine Infectious Anemia. **Advances in Virus Research.**, v. 34, p. 189-215, 1988.

CHRISTODOULOPOULOS, G. Maedi-Visna: Clinical review and short reference on the disease status in Mediterranean countries. **Small Ruminant Research**, v.62, p. 47-53, 2006.

CLEMENTS, J.E. ; PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v.32, p.97-109, 1994.

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

CRANE, S.E. et al. Separate epitopes in the envelope of Visna Vírus are responsible for fusion and neutralization: biological implications for anti-fusion antibodies in limiting vírus replication. **Journal of Virology**, v. 62, p. 2680-2685, 1988.

DAHLBERG, J. E., GASKIN, J. M., PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. **Journal of Virology**, v. 39, p. 914-919, 1981.

DANTAS, T. V.M. **Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de MAEDI-VISNA VÍRUS de ovinos.** 2004, 78f. Dissertação (Mestrado em Reprodução e sanidade em pequenos ruminantes) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

DAVIES, J.M., ROBINSON, W.F., CARNEGIE, P.R. Antibody reactivity to the transmembrane protein of the caprine arthritis encephalitis virus correlates with severity of arthritis: no evidence for the involvement of epitope mimicry. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 60, p.131-147, 1997.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, et al. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**. 57, n. 5, p. 684-688, 1996.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. **Relatório de Consultoria - Programa de Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (PCAEV-II)**. Sobral: EMBRAPA. 1996, 110p.

ERIKSSON, K. et al. In vivo depletion of CD8+ cells does not affect primary maedi visna vírus infection in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopatology**. v. 70, p. 173-187, 1999.

FEVEREIRO, M.T. ; BARROS, S.S. Caracterização biológica e molecular de um lentivírus de ovino isolado em Portugal. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 99, p. 27-39, 2004.

GENDELMAN, H.E. et al. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **Journal of Virology**, v.58, p.67-74, 1986.

GEORGIEVA, M. et al. A Dot-immunobinding assay to detect antibodies against avian reoviruses. **Experimental pathology and parasitology**, v. 518, P.35-38, 2002.

GOGOLEWSKI, R.P et al. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 1233-1240, 1985.

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.

GOUVEIA, A.M.G et al. Lentivirose de pequenos ruminantes em ovinos e caprinos em Minas Gerais. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11., 2003, CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5., 2003, Salvador; CONGRESSO NOREDESTINO DE BUIATRIA, 3., 2003 Salvador. **Anais...** Olinda: ABB, 2003, p. 52.

GREGO et al. Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-based immunoassay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.4, p. 828-832, 2002.

HAASE, T.A., BARINGER, J.R. The structural polypeptides of RNA slow viruses. **Virology**, v. 57, p. 238-250, 1974.

HANDISTATUS II. Disponível em http://www.oie.int/hs2/ci_annee.asp. Acesso em: 17.08.200

HARLON, E., LANE, D. Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 865p.

HERBELLING, R.L. et al. Dot-immunobinding assay compared with enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and specific detection of retroviruses antibody induced by human or simian acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 4, P. 765-767, 1988.

HERBELLING, R.L. et al. Serodiagnosis of rabies by dot-immunobinding assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.25, p. 1262-1264, 1987.

HERBELING, R.L. ; KALTER, S.S. Rapid Dot- immunbinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23 , n.1, p. 109-113, 1986.

HERRMANN, L. M. et al. Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 862-865, 2003a.

HIBI, T. ; SAITO, Y. A Dot immunobinding assay for the detection of Tobacco Mosaic Virus in infected tissues. **Journal of General Virology**, V. 66, P. 1191-1194, 1985.

HOWERS, D. J. ; SCHAKE Jr., J. An improved ELISA for the detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in a one-step assay. **Journal of Immunology Methods**. v.98, p.151-154, 1987.

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

HULLINGER, G. A., et al. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. **Virology**, v. 192, p. 328-331, 1993.

ICTVdB - **The Universal Virus Database**, version 3 (2004) Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>>

JOHNSON, G.C. et al. Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. **Infection and Immunity**, v. 41, p. 657-65, 1983.

KAJIKAWA, O. et al. Analysis of antibody responses to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 764-770, 1990.

KARANIKOLAOU, K. et al. Detection of small ruminant lentiviruses by PCR and serology tests in field samples of animals from Greece. **Small Ruminant Research**, v. 58, p. 181-187, 2005.

KEEN, J. E. et al. Effect of ovine lentivirus infection on ewe and lamb productivity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 30, p. 155-169, 1997.

KENNEDY-STOSKOPOF, S. ; NARAYAN, O. Neutralizing antibodies to Visna lentivirus: mechanism of action and possible role in virus persistence. **Journal of Virology**, v. 59, p. 37-44, 1986.

KNOWLES, D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v. 13, p.1-11 , 1997.

KNOWLES, D.P., et al. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine Ientiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, n. 1, p. 243-245, 1994.

KWANG, J., CUTLIP, R.C. Analysis of antibody response to ovine lentivirus by using viral gene products expressed in a prokaryotic system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 188, p. 20-27, 1992.

LACERENZA, D. et al. Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 264-271, 2006.

LAEMMI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LARA, M.C.C.S.H. et al. Identificação imunoserológica de anticorpos anti-vírus da artrite-encefalite dos caprinos: comparação das técnicas de imunodifusão em gel de agar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, p. 1-4, 2002.

LEGINAIGOIKOA, I. et al. Horizontal Maedi-Visna virus (MVV) infection in adult dairy-sheep raised under varying MVV-infection pressures investigated by ELISA and PCR. **Research Veterinary Science**, v. 80, p. 235-241, 2006.

LEONARDI, M.S., et al. A dot-ELISA for the detection of IgG antibodies to mumps and varicella viruses. **Journal of clinical laboratory analysis**, v.4, n.3, p.165-169, 1990.

LIN, T. ; HALBERT, S.R.P. Rapid Dot enzyme immunoassay for the detection of antibodies to cytomegalovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, n.1, p.7-11, 1986.

MADHUSUDANA, S. N. et al. Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by dot blot enzyme immunoassay. **International Journal of Infectious Disease**, v.8, p. 339-345, 2004.

MARSH, H. *apud* PASICK, J. Maedi-Visna vírus and Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus: Distinct species or *quasispecies* and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.

McGUIRE, T. C. et al. Caprine arthritis encephalitis lentivirus transmission and disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, n. 160, p. 61-75, 1990.

MEHTA, P.D. ; THORMAR, H. Comparative studies of Visna and Maedi viruses as antigens. **Infection and Immunity**, v.11, p. 829-834, 1975.

MOOJEN, V. et al. Evidência de infecção pelo lentivírus (maedi visna/artrite encefalite caprina) em caprinos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, v. 14, p.77-78, 1986.

MORDASINI et al. Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 981-991, 2006.

NAEEN, K. ; Goyal, M. S. A dot immunobinding assay on nitrocellulose for the detection of bovid herpesvirus-antibodies. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, p.107-110, 1990.

NARAYAN, O. et al. The lentivirus of sheep and goats. In: _____. **The Retroviridae**. New York: Plenum, 1993. cap. 4, p. 229-255.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Código sanitário para los animales terrestres (2005)**. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/OIE/organization/em_LR.htm> Acesso em: 15.05. 2006.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. World Organization for Animal Health. p. 369-373, 1996.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos e ovinos em abatedouros do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 947-949, 2006.

OZYORUK, F. et al. Monoclonal antibodies to conformational epitopes of the surface glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus: Potential application to competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies in goat sera. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, n.1, p.44-51, 2001.

PASICK, J. Maedi-Visna vírus and Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus: Distinct species ou *quasispecies* and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.

PETERHANS, E. et al. Routes of transmission and cosequences of small ruminant lentiviruses (SLRVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v. 35, p. 257-274, 2004.

PINHEIRO, R.R. . **Vírus da Artrite Encefalite Caprina**: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunienzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará. 2001. 115f. Tese (doutorado em medicina veterinária preventiva e epidemiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

PINHEIRO et al. Desenvolvimento de *dot-blot* para detecção de anticorpos para o vírusda Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p. 51-56, 2006.

PINHEIRO, R. R. et al. Custo dos antígenos no diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, p. 110-113, 2006.

PISONI, G. et al. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology**, v. 339, p. 147-152, 2005.

PREZIUSO, S. et al. Colostral transmission of maedi visna: sites of viral entry in lambs born from exeperimentally infected ewes. **Veterinary Microbiology**, v. 104, 157-164, 2004.

PRIMO, T.S. Enquete soropidemiológica da Maei Visna no estado do Ceará. In: SEMANA DA CAPRINOCULTURA E OVINOCULTURA BRASILEIRAS.(5.: 2006: Campo Grande), **Anais**. Campo Grande, CD-ROM.

REED, L.J. ; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. **American Journal of Hygiene**, v. 27,p. 493-497, 1938.

REIS, J.K.P., LEITE, R.C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anemia in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v.20, p.261-267, 1994.

REISCHAK, D. et al. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.22, p. 7-12, 2002a.

REISCHAK, D et al. Importância da escolha dos reagentes para o diagnóstico de infecção por lentivirus de pequenos ruminantes em caprinos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 8, n. 2, p. 51-56, 2002b.

RIBAS ANTUNEZ, M. A. et al. Evaluation of a Dot-Elisa for the detection of a Rotavirus antigen. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.48, n.1, p.59-61, 1996.

ROY, P. ; VENUGOPALAN, A.T.. Dot-enzyme linked immunosorbent assay for demonstration of Newcastle disease virus infection. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v.22, n.1, p.31-37, 1999.

SCHROEDER, B. A., OLIVER, R. E., CATHCART, A. The development and evolution of end ELISA for the detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus in goat. **New Zealand Veterinary Journal** , v. 33, n. 12, p. 213-219, 1985.

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

SIGURDSSON B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study. **British Veterinary Journal**,1954; 110: 255-270

SIHNOVEN, L. et al. Serological survey and epidemiological investigation of Maedi-visna in sheep in Finland. **Veterinary Microbiology**, V. 65, P. 265-270, 1999.

SILVA, J.B.A. et al. Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 726-731, 2005.

SINGH, I. et al. Immune response to individual Maedi-Visna Virus *gag* antigens. **Journal of Virology**. v. 80, p. 912-919, 2006.

SOARES, C.O. PRINCÍPIOS, PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DAS PROVAS SOROLÓGICAS: TÉCNICAS IMUNOENZIMÁTICAS In:_____. Imunodiagnóstico em medicina veterinária. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001, cap. 6, p. 145 – 175.

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

SOTA, M. D. de la. **Manual de procedimentos: Maedi Visna**. Buenos Aires: SENASA, 2004. 16p.

STRAUB, O.C. Maedi-Visna virus infection in sheep .History and present knowledge. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v.27, p. 1-5, 2004.

SULIMENKO, T. ; DRABER, P. A fast and simple dot-immunobinding assay for quantification of mouse immunoglobulins in hybridoma culture supernadants. **Journal of Immunological Methods**, v.289, p. 89-95, 2004.

SUMI, M.G. et al. Rapad diagnosis of tuberculosis meningitis by Dot Immunobinding Assay to detect mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p. 3925-3927, 1999.

TEIXEIRA, M.F.S. et al. Comparação de técnicas de imunodifusão em gel de agarose para identificação de artrite encefalite caprina. In: Anais da IIIª SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 1998, p.246, Fortaleza.

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

TORSTEINSDOTTIR, S. et al. Immune response to maedi-visna virus. **Frontiers in Bioscience**, v.12, p. 1532-1543, 2007.

TORTORA, G.J. et al. VÍRUS. In:_____. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000, cap. 13, p. 36—392.

TOWBIN, H., et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet.s: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v.76, p. 4350-4354, 1979.

VAREA, R. et al. Early detection of Maedi Visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p. 301-307, 2001

VAZ de LIMA, L.R et al. Measles serodiagnosis: standardization and evaluation of a Dot-ELISA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.36, p.139-147, 1994.

WILILIAMS-FULTON, N.R.; SIMARD, C.L. Evaluation of two management procedure for the control of Maedi-Visna. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 53, 419-423, 1989.

WISE, D.J. et al. **Diagnóstico laboratorial de infecções víricas (2005)**. Disponível em: < www.ivis.org > Acesso em: 15 de maio de 2006.

ZAHA, A. (coord). REPLICAÇÃO DO DNA. In: _____. **Biologia Molecular Básica**, Porto Alegre: Mercado Aberto, 2000, cap.5, p. 93-115.