



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIAS E CLÍNICAS**

JULIANNA ALVES TORRES

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA (CAE) UTILIZANDO UM ENSAIO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).**

Salvador
2005

JULIANNA ALVES TORRES

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA ARTRITE-
ENCEFALITE CAPRINA (CAE) UTILIZANDO UM ENSAIO
IMUNOENZIMÁTICO (ELISA).**

Monografia apresentada ao curso de graduação em Medicina Veterinária, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Profa.^a Dra. Sílvia Inês Sardi
Instituto de Ciências da Saúde
Laboratório de Virologia

Salvador
2005.2/2005

TERMO DE APROVAÇÃO

Julianna Alves Torres

Detecção de anticorpos contra o vírus da artrite-encefalite caprina (CAE)
utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA).

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Dra. Sílvia Inês Sardi
Presidente da Banca

Antônio Vicente Magnavita Anunciação

Izana Fitterman

Apresentada em: 19/12/ 2005

**Dedico todo este trabalho como todo o meu amor
a minha querida vovó Julia, por suas palavras, sua
dedicação e o seu carinho...Um exemplo de Vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu DEUS pai todo poderoso, por estar sempre comigo em tudo que faço;

As minhas Pérolas Divinas, Minha MÃE por seu otimismo e dedicação e ao meu PAI pelo orgulho e coragem, e aos dois pelo amor e pela ausência em momentos preciosos;

Aos meus IRMÃOS Lula e Marcelo, pelo carinho e cuidado com a irmã caçula e por acreditarem sempre em mim...Amo vocês;

Aos ANIMAIS por serem a razão de um Médico Veterinário e pelos quais tanto nos dedicamos;

A LUCAS (MEU NEGUINHO) por estar comigo nessa caminhada, pelo seu apoio incondicional, pelo amor e compreensão...Tudo que eu sempre sonhei;

A minha TIA TEREZA pela sua paixão e cuidados desde que nasci; aos MEUS FAMILIARES por torcerem pelo meu sucesso e por serem à base da minha existência;

Aos MEUS AMIGOS... LUCILLA por ser quem você é; RITA por fazer da nossa amizade uma constante; LARISSA e LORENA por serem inesquecíveis; VANESSA, PRISCILA, LUCIANA e JOÃO meus amigos do trote da veterinária até sempre; CATARINA pelas palavras e pela maturidade; A MOISÉS pela dedicação e conselhos; A DÉBORA por sua serenidade e equilíbrio; E a todos pelos momentos maravilhosos, por serem o meu porto-seguro e por iluminarem a minha vida, cada um de forma especial;

A minha TIA RUSA pelo apoio e por sempre estar vibrando com as minhas conquistas;

A ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UFBA, obrigada pela base científica e prática, as amizades que construí, as farras, viagens... Momentos que jamais irei esquecer. Aos MESTRES que souberam honrar o que escolheram fazer, em especial ao PROF. Dr. JOSELITO pela motivação e por direcionar meus caminhos e ao meu querido CDP e todos que o compõe por ser fonte inesgotável de conhecimentos.

Ao LABORATÓRIO DE VIROLOGIA DO ICS pelos conhecimentos e amizades conquistadas e a Dra. SILVIA SARDI pela dedicação e oportunidade.

E a VOCÊ, que de alguma forma contribuiu para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, permitindo que me tornasse o que sou. A todos vocês agradeço hoje e sempre, simplesmente porque cada pessoa que passa em minha vida é única.

RESUMO

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAE) causa uma doença severa e progressiva caracterizada pelas manifestações clínicas de encefalomielite, mastite, pneumonia e artrite. O diagnóstico pode ser baseado na detecção de anticorpos contra o vírus, através das técnicas de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e enzime linked immunosorbent assay (ELISA). O objetivo deste trabalho foi utilizar células da membrana sinovial de cabras MSC infectadas com o vírus da CAE como antígeno viral para detecção de anticorpos contra o vírus, em um teste imunoenzimático (ELISA). Neste trabalho foram coletadas 100 amostras de soros de cabras clinicamente saudáveis, os quais foram submetidos às técnicas de IDGA e ELISA. Na padronização do ELISA foi determinado o "cutoff" ou valor de corte para determinar a soropositividade sendo a mesma de 0,252. Os resultados deste trabalho mostram que a técnica de IDGA detectou 24% de amostras positivas, enquanto que a técnica de ELISA detectou 43%, mostrando pelo índice *kappa* uma concordância moderada (0,464) entre essas técnicas. Este trabalho mostra que o ELISA foi mais sensível para detectar anticorpos contra o vírus da CAE comparado com a IDGA. Este estudo precisa ainda de um processamento de um maior número de amostras para mostrar a sensibilidade deste teste na detecção de animais positivos.

Palavras chaves: Vírus, CAE, diagnóstico, antígeno viral, ELISA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 ASPECTOS GERAIS DA ARTEITE-ENCEFALITE CAPRINA (CAE)	13
2.2 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL.....	15
2.2.1 Células hospedeiras do vírus.....	17
2.2.2 Restrição a replicação.....	18
2.3 PATOGENIA.....	19
2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS.....	20
2.4.1 Forma artrítica.....	21
2.4.2 Forma mamítica.....	22
2.4.3 Forma encefálica.....	22
2.4.4 Forma respiratória.....	23
2.5 TRANSMISSÃO.....	23
A) Contato direto.....	24
B) leite.....	24
C) Transmissão vertical.....	25
D) Transmissão sexual.....	26
2.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	26
2.7 DIAGNÓSTICO.....	28
2.7.1 Clínico.....	28
2.7.2 Laboratorial.....	29
2.7.2.1 Detecção sorológica.....	29
A) Imunodifusão em gel de agarose (IDGA).....	29
B) ELISA (técnica imunoenzimática).....	30
C) Outras provas sorológicas.....	31
2.7.2.2 Detecção do vírus ou componentes virais.....	32
A) Isolamento viral.....	32
B) PCR.....	32
2.8 CONTROLE E PROFILAXIA.....	33
2.9 SITUAÇÃO NO BRASIL.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 CULTIVO CELULAR DA MEMBRANA SINOVIAL DE CABRA (MSC).....	37
4.2 VÍRUS.....	38
4.3 OBTENÇÃO DE SORO HIPERIMUNE DE COELHO.....	38
4.4 PRODUÇÃO DE ANTÍGENO VIRAL PARA O TESTE DE ELISA..	39
4.5 TITULAÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL.....	39
4.6 DESENHO EXPERIMENTAL.....	40
4.6.1 Animais.....	40
4.6.2 Colheita das amostras: Soro.....	40
4.7 DETECÇÃO SOROLÓGICA POR IDGA.....	41

4.8 DETECÇÃO SOROLÓGICA POR ELISA.....	42
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA CAE PELA IDGA.....	44
5.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA CAE POR ELISA.....	45
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	52
8. REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO	59
APÊNDICE.....	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Rebanho caprino acometido pela CAE com manifestação clínica de artrite..... 15
- Figura 2** - Placa de petri contendo gel de agarose para imunodifusão, perfurada para distribuição dos antígenos (A), soros-testes (ST) e soros-reagentes (SR).....30
- Figura 3** - Figura esquemática das reações com os soros negativos e positivos visualizados no teste de Imunodifusão em Gel de Agarose..... 41
- Figura 4** - ELISA de captura.....43
- Figura 5** - Resultados obtidos através da técnica de IDGA para detecção de anticorpos anti-CAEV em 100 soros no estado da Bahia..... 44
- Figura 6** - Resultados obtidos através da técnica de ELISA para detecção de anticorpos anti – vírus da CAE em 100 amostras se soro..... 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparação dos resultados obtidos através da técnica do teste imunoenzimático – ELISA em amostras de soro e por IDGA.....	47
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAE** – artrite-encefalite caprina
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- dn** – PCR – nested polymerase chain reaction
- ELISA** – enzyme-linked immunosorbent assay
- IDGA** – imunodifusão em gel de agarose
- IFN** – interferon
- IN** – integrase
- LVPR** – *lentivirus* de pequenos ruminantes
- MEM – G** – meio essencial mínimo glasgow
- MVV** – maedi – visna vírus
- MSC** – membrana sinovial caprina
- PEG** - polietilenoglicol
- PPO** – pneumonia progressiva ovina
- RNA** – ácido ribonucléico
- SFB** – soro fetal bovino
- SRD** – sem raça definida
- TR** – transcriptase reversa

1. INTRODUÇÃO

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAE) pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* (PHELPS, SMITH, 1993). É um patógeno que causa uma doença severa e progressiva em caprinos determinando importantes perdas econômicas decorrentes da morte de animais jovens, diminuição da produção láctea e perda de peso devido à dificuldade de locomoção. As manifestações clínicas desta doença são encefalomielite, artrite, pneumonia intersticial e mastite (CALLADO *et al.*, 2001; PHELPS, SMITH, 1993).

A CAE é uma doença infecciosa específica dos caprinos, caracterizando-se por um longo período de incubação com uma evolução clínica lenta e progressiva (FRANKE, 1998; HUSO *et al.*, 1988). A via mais comum de transmissão do vírus é a ingestão do colostro ou leite de fêmeas infectadas. O vírus também pode ser transmitido por via materno – fetal ou durante o parto (EAST *et al.*, 1993), fômites, saliva, urina, fezes e/ou secreções respiratórias (EAST *et al.*, 1993; GUEDES *et al.*, 2001).

Programas para o controle e erradicação do vírus para serem desenvolvidos precisam de testes diagnósticos sensíveis e específicos. A prova utilizada como referência no diagnóstico da infecção é a imunodifusão em gel de agarose (IDGA). Este teste sorológico é pouco sensível para detectar animais com baixos títulos de anticorpos, facilitando a permanência de animais falso-negativos no rebanho. Além disso, certo número de animais pode apresentar soroconversão tardia ou ainda,

reações intermitentes de soropositividade e soronegatividade (EAST *et al.*, 1993; HANSON *et al.*, 1996; PHELPS, SMITH, 1993). Entretanto, a IDGA até o momento é o teste de referência nacional para detecção de animais infectados pela CAE (OIE, 1997).

Visando avaliar uma outra técnica sorológica para diagnóstico da CAE, o presente trabalho tem como objetivo avaliar um teste sorológico de tipo imunoenzimático (ELISA).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA ARTRITE - ENCEFALITE CAPRINA

O vírus da CAE pertence a família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. Estes se caracterizam por causar doenças degenerativas crônicas, com períodos de incubação relativamente longos, persistência e replicação viral na presença de imunidade específica. Neste gênero, encontramos outros vírus de importância para animais domésticos, entre eles o vírus da doença maedi-visna de ovinos e o vírus da anemia infecciosa eqüina, e em seres humanos, encontramos os vírus relacionados à síndrome de imunodeficiência adquirida (vírus da linfadenopatia/ HIV 1 e HIV 2) (COFFIN, 2001; NARAYAN *et al.*, 1980).

A CAE é um grande problema para produção de cabras leiteiras. A prevalência de animais infectados em países que praticam a caprinocultura intensiva é igual ou superior a 74% (FRANKE, 1998; HANSON *et al.*, 1996).

Estudos filogenéticos realizados com amostras de *Lentivirus* de pequenos ruminantes (LVPR) têm indicado que esses vírus devem ser considerados como quasispécies virais e que tem a capacidade de infectar tanto ovinos quanto caprinos (LIMA *et al.*, 2004). Pyper *et al.* (1986), demonstraram que existe uma relação genética entre o vírus da Maedi-Visna, vírus da CAE, e o vírus linfotrópico tipo 3 célula T humana – HTLV 3 (agente etiológico que causa síndrome de deficiência imune), existindo uma correlação nas propriedades biológicas destas viroses humanas e de animais.

Os LVPR apresentam-se como vírions envelopados de 80 a 100 nm de diâmetro contendo duas moléculas idênticas de ácido ribonucléico (RNA), um capsídeo de simetria icosaédrica recoberto por um envelope viral, no qual se projetam as glicoproteínas. Apresentam uma grande quantidade de ácido siálico na superfície do vírus e os carboidratos presentes nessa superfície são importantes porque protegem a proteína viral da digestão das proteases e de uma rápida neutralização viral por anticorpos (COFFIN, 2001; HUSO *et al.*, 1988).

O genoma dos *Retrovírus* apresenta alguns aspectos característicos, como: RNA diplóide, contendo associado ao material genético um RNA transportador específico, cuja função é de iniciador da replicação, além da capacidade de sintetizar uma enzima exclusiva dos *Retrovírus*, a transcriptase reversa (TR) que atua como ácido desoxiribonucléico (DNA) polimerase RNA dependente. Os genes que compõem o genoma dos *Retrovírus* são basicamente três: o gene *gag* que codifica uma poliproteína que é subseqüentemente clivada em proteína da matriz, proteína do capsídeo e proteína ligada ao ácido nucléico; gene *pol* que codifica a TR e a Integrase (IN); e o gene *env* que codifica duas glicoproteínas do envelope viral (COFFIN, 2001; MURPHY *et al.*, 1999).

O vírus se replica em células de membrana sinovial caprina (MSC) sendo que Rolland *et al.* (2004) mostra que essas células imortalizadas da membrana sinovial de cabras se mostraram susceptíveis a infecção ao vírus da CAE e o Maedi-Visna vírus (MVV), e foram capazes de propagar o vírus. Assim, células

dessa linha se mostram úteis para os estudos de replicação e multiplicação “*in vitro*”.



FIGURA 1. Rebanho caprino acometido pela CAE com manifestação clínica de artrite (Jornal A TARDE – Rural – 26/04/1999).

2.2 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O ciclo de replicação das lentiviruses começa ligando as glicoproteínas de superfície (gp 135) do envelope viral as células receptoras susceptíveis. Ligado ao receptor da célula hospedeira, o complexo vírus-receptor é internalizado por fusão resultando na penetração do vírus dentro do citoplasma celular. Em alguns casos foi mostrado que a entrada do vírus pode ser também por endocitose celular (HULLINGER *et al.* 1993; HARKISS, WATT, 1990; COOFIN, 2001; MURPHY, *et al.*, 1999). A disseminação da infecção celular “*in vitro*” pode

também ocorrer via contato célula-célula, através da fusão celular induzida pelo vírus. Embora ambos os mecanismos ocorram, a transmissão do vírus através da fusão célula – célula tem indicativo de ser mais importante “*in vivo*” (HARKISS, WATT, 1990; COOFIN, 2001; MURPHY, *et al.*, 1999).

Após entrada do vírus no citoplasma da célula, a enzima TR copia o RNA viral sintetizando um DNA de fita dupla. O capsídeo é removido e o DNA viral é transportado ao núcleo, onde, enzimas especializadas, inserem, randomicamente, este DNA viral no genoma da célula hospedeira, compondo o “provírus”. Este, uma vez integrado ao DNA celular é estável, e durante a replicação celular é transmitido à progênie como parte do genoma celular (COOFIN, 2001). Na forma provírus, o vírus pode permanecer latente por meses ou anos (HARKISS, WATT, 1990).

Em condições adequadas à replicação, o DNA proviral é transcrito em RNA genômico viral e RNA mensageiro, este último é traduzido nos ribossomos para a síntese de proteínas virais. O RNA genômico viral e as proteínas estruturais são montadas dentro do vírion maduro e a partícula viral recém formada “brota” através da membrana celular. O vírus liberado no fluído extracelular é capaz de infectar outras células para iniciar um novo ciclo viral (HARKISS, WATT, 1990; COOFIN, 2001; MURPHY, *et al.*, 1999).

Existem diversos mecanismos possíveis pelo qual a infecção com *Retrovírus* pode levar à destruição celular: (1) morte celular mediada pelo sistema imune; (2) toxicidade direta por produtos dos genes virais; (3) replicação

intensiva do vírus levando a uma opressão das funções necessárias à sobrevivência celular e (4) os efeitos indiretos dos produtos dos genes virais nas interações celulares necessárias as suas funções e sobrevivência. Entretanto, existem certas condições em que a replicação viral pode acontecer sem uma significativa destruição de células infectadas (MURPHY, *et al.*, 1999).

2.2.1 Células hospedeiras do vírus

As células da linhagem monócito/macrófago são as principais células hospedeiras do vírus da CAE "*in vivo*", e é nestas células que o vírus persiste por toda vida do animal. A replicação viral é dependente do nível de maturação/diferenciação da célula monocítica (MURPHY *et al.*, 1999; PHELPS, SMITH, 1993).

Os monócitos suportam os estágios iniciais de replicação viral, entretanto, a replicação somente se completa quando as células maturam para macrófagos. Este fenômeno, conhecido como restrição da replicação, permite ao vírus permanecer nos monócitos por períodos prolongados e indetectável para o sistema imune (GENDELMAN *et al.*, 1986; MURPHY *et al.*, 1999; ZINK *et al.*, (1987). Os macrófagos são a principal fonte do vírus em animais experimental ou naturalmente infectados e enquanto a montagem do vírion acontece intracelularmente em vacúolos citoplasmáticos, não é visível nenhuma alteração celular (NARAYAN *et al.*, 1982).

O vírus da CAE apresenta um grande tropismo, sendo a susceptibilidade de células epiteliais de diferentes órgãos demonstrada tanto "*in vitro*", como "*in vivo*" (LAMARA *et al.*, 2001). O RNA viral do vírus da CAE foi detectado em células semelhantes a macrófagos no pulmão, fígado, baço, linfonodos, nas células de revestimento das veias do cérebro e sinoviais, células epiteliais das criptas intestinais, túbulos renais e folículos tireoidianos (ZINK *et al.*, 1990). Também se demonstrou que as células epiteliais da glândula mamária, células da granulosa derivadas dos ovários e células epiteliais do oviduto são susceptíveis a infecção "*in vitro*" (FIENI *et al.*, 2003; LAMARA *et al.*, 2001; LAMARA *et al.*, 2002; PHELPS, SMITH, 1993) Essas células da granulosa podem servir como reservatório durante a fase sub-clínica da infecção (LAMARA *et al.*, 2001). Assim, para Zink, *et al.* (1990), o tropismo celular do vírus da CAE pode se estender além do estreito limite dos monócitos e macrófagos.

2.2.2 Restrição a replicação

O genoma do vírus é transcrito apenas quando os monócitos, células alvo, maturam a macrófagos. Porém existem outros tipos de restrição que a replicação viral esta sujeita, como as evidências que não somente a infecção foi circunscrita aos macrófagos, mas também num pequeno número destas células (GENDELMAN *et al.*, 1986). Outro fator de restrição ocorre porque os monócitos têm uma reduzida habilidade de suportar a replicação viral (ZINK *et al.*, 1987).

Em um estudo realizado por Zink e Narayan (1989), foi demonstrado que os *Lentivirus* induzem o interferon (LV - IFN) inibindo a proliferação de monócitos

e macrófagos. Sendo que o ciclo completo do vírus depende da maturação e proliferação de monócitos e macrófagos, LV-IFN indiretamente inibe a replicação do vírus da CAE em monócitos e macrófagos nos animais. Em adição, LV – IFN inibe a replicação do ciclo do vírus da CAE e prontamente macrófagos em estágio de maturação na transcrição para RNA viral em cabras. Além disso, LV-IFN causa uma dramática redução na função de fusão para o vírus, reduzindo a eficiência da disseminação do vírus.

2.3 PATOGENIA

Os vírus da família *Retroviridae* caracterizam-se por um longo período de incubação, por isso a denominação de *slow virus* (COOFIN, 2001). Vários meses podem passar entre a infecção e a detecção de anticorpos para o vírus. Essa variação para expressar anticorpos em cabras naturalmente infectadas ainda não está bem estudado (HANSON *et al.*, 1996).

O vírus da CAE infecta monócitos e macrófagos, induzindo a infecção persistente, apesar da produção de anticorpos pelo hospedeiro. A "replicação restrita" permite que o vírus permaneça latente nos monócitos do hospedeiro e não detectável pelo sistema imune. Como mecanismos de persistência viral propostos, incluem-se a presença do próvirus DNA; replicação viral que aguarda a diferenciação de monócitos em macrófagos nos tecidos; baixa concentração de anticorpos neutralizantes e mutação viral de genes *env* que escapa ao sistema imune (REILLY, *et al.*, 2004).

Os macrófagos infectados pelo vírus da CAE estimulam de forma anormal os linfócitos, induzindo a uma hiper-proliferação e reatividade linfocitária inespecífica, o que justifica os danos imuno-mediados que caracterizam a evolução das lentivirose clássicas. No caso da CAE, esses danos vão se localizar nas articulações nos animais adultos e no sistema nervoso central, nos animais jovens (GARCIA, 1993).

Os tecidos de tropismo do vírus da CAE incluem articulações, glândula mamária, pulmão e cérebro. Nesses locais o vírus provoca inflamação crônica pelo estímulo à resposta imune do hospedeiro. O vírus pode sofrer mutações, o que dificulta a ação dos mecanismos de resposta imune do animal. Frequentemente o vírus da CAE pode ser isolado do fluido sinovial e no leite de animais infectados. Em geral, há soroconversão dos caprinos dentro de 2 a 8 semanas, porém pode haver longo período de latência clínica (REILLY, *et al.*, 2004).

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

A CAE é uma enfermidade que caracteriza-se por uma paralisia ascendente afebril em cabritos, e por sinovite e artrite crônica em animais adultos (GARCIA, 1993). A grande maioria dos animais infectados permanece assintomática (REILLY, *et al.*, 2004).

2.4.1 Forma Artrítica

Essa manifestação clínica geralmente acomete cabras adultas, com mais de um ano de idade. A articulação do carpo está freqüentemente envolvida com os sinais clínicos de distensão da cápsula articular com variáveis níveis de manqueira (PHELPS, SMITH, 1993; FRANKE, 1998). No estágio inicial, a tumefação articular pode ser intermitente e a claudicação mínima (REILLY, *et al.*, 2004).

A evolução da doença é variável; alguns animais vão definhando após alguns anos e outros permanecem inalteráveis durante vários anos. À medida que a doença evolui, os animais tornam-se claudicantes ou se posicionam em decúbito e se debilitam (REILLY, *et al.*, 2004). Um agravamento de artrite em cabras ocorre, geralmente, a partir da terceira lactação (FRANKE, 1998).

Após situações de prolongado estresse, a artrite pode se manifestar de forma aguda. Os animais em fase avançada da artrite emagrecem, apesar do apetite inalterado, e sua pelagem torna-se ressecada, podem apresentar claudicação e tem a sua produção de leite diminuída. Os problemas de locomoção e a diminuição da produtividade geralmente levam ao abate precoce dos animais (FRANKE, 1998).

2.4.2 Forma Mamítica

Essa forma clínica caracteriza-se por: a) mamite intersticial, provocando o endurecimento e a atrofia da glândula mamária atingida; b) mamite difusa, que acontece por ocasião do parto que leva ao rápido descarte dos animais em propriedades de leite pela baixa rentabilidade; e c) mamite nodular, que é uma forma crônica, o leite tem aspecto normal, mas tem sua produção progressivamente reduzida e há presença de nódulos na glândula mamária. O leite de cabra infectada não apresenta alterações visíveis, porém podem surgir problemas na sua industrialização, como a formação insuficiente de coalho (FRANKE, 1998).

2.4.3 Forma Encefálica

A forma neurológica da enfermidade acomete cabritos com 1 a 4 meses de idade e, ocasionalmente, adultos. Os sinais clínicos incluem ataxia secundária e paresia que evolui para tetraplegia. À medida que a doença evolui os cabritos tornam-se cegos, apresentam rotação e desvio da cabeça, paralisia facial e opistótono (FRANKE, 1998; PHELPS, SMITH, 1993; REILLY, *et al.*, 2004).

Os cabritos conservam o apetite e o estado de consciência até o final da evolução do quadro clínico, que pode demorar de 1 a 2 semanas. Os animais afetados devem ser sacrificados para evitar um sofrimento prolongado (FRANKE, 1998; REILLY, *et al.*, 2004).

2.4.4 Forma Respiratória

O vírus da CAE causa uma pneumonia intersticial em cabritos e em caprinos adultos infectados. A doença provoca uma pneumonia crônica, perda de peso e dispnéia (REILLY, *et al.*, 2004). Essa pneumonia intersticial pode evoluir para pneumonia broncointersticial, provavelmente pela invasão pulmonar por agentes bacterianos secundários (SERAKIDES *et al.*, 1996).

Esta forma respiratória pode apresentar uma evolução aguda, após grave situação de estresse e/ou no estágio avançado da gestação. Normalmente a evolução clínica do quadro manifesta-se pelo emagrecimento progressivo e pelagem ressecada (FRANKE, 1998). As lesões se instalam principalmente no lobo caudal ou no crânioventral. As lesões de pneumonia intersticial por vírus da CAE se assemelham muitas daquelas da pneumonia progressiva ovina (PPO) (REILLY, *et al.*, 2004).

2.5 TRANSMISSÃO

A doença causada pelo vírus da CAE pode levar vários meses, às vezes anos, para se manifestar. Os animais que estão nessa condição, os portadores são, representam um importante elo na transmissão da doença, pois aparentemente sadios, estão eliminando vírus e contaminando outros animais (GARCIA, 1993).

A) Contato Direto

O contato direto entre os animais, bem como toda a forma de contato indireto com os líquidos corporais (principalmente o sangue), também são importantes meios de transmissão do vírus (FRANKE, 1998). Assim, agulhas, tatuadores e aplicadores de brincos, entre outros, podem atuar no contágio da CAE (GARCIA, 1993). A transmissão horizontal se dá eficientemente em locais com alta densidade de caprinos, através de fezes, saliva e urina (EAST *et al.*, 1993; PHELPS, SMITH, 1993). A via aerógena pode ser uma provável rota de infecção para o vírus da CAE já que apresentou imunomarcagem positiva em macrófagos alveolares em inoculação experimental por via intranasal (GUEDES *et al.*, 2001).

B) Leite

A via mais comum de transmissão do vírus da CAE é a ingestão de células infectadas presentes no leite ou colostro de animais infectados (FRANKE, 1998; MASSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999; REILLY, *et al.*, 2004). Através de pesquisas foi demonstrado que somente uma exposição oral com leite contendo 2×10^7 DICT₅₀ resultou na infecção dos animais. A transmissão do vírus através da ordenha mecânica também tem sido demonstrada sugerindo que as máquinas utilizadas para ordenhar os animais podem servir como reservatório de leite contaminado, e um possível mecanismo de abrigar o vírus na glândula mamária. A infecção experimental através de uma infusão mamária de 2×10^7 DICT₅₀ do vírus da CAE resultou na soroconversão de 100% das fêmeas soronegativas (East *et al.*, 1993).

Uma seqüência de eventos está envolvida na transmissão do vírus na alimentação do rebanho pelo leite e na indução de mastite. Existe uma elevada eficiência na transmissão de vírus da CAE pelo leite, que conduziram a larga distribuição desse vírus pelo mundo (MASSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999). O vírus pode ser facilmente isolado do tecido mamário, demonstrando que a glândula mamária é um órgão alvo importante na infecção (LERONDELLE *et al.*, 1989; LERONDELLE *et al.*, 1999).

C) Transmissão Vertical

A transmissão vertical da CAE, não é completamente compreendida. A infecção da fêmea positiva para o embrião ou feto necessita ser investigada. Estudos demonstraram que cabritos, filhos de mães soropositivas nascidos através de cesárea tornaram-se soropositivos apesar de separados, e de não ingerir o colostro. A cirurgia eliminou a possibilidade de transmissão durante a passagem do cabrito no canal do parto e o contato com secreções maternas, sugerindo assim que a transmissão do vírus pode ter sido transplacentária (ADAMS *et al.*, 1983).

Em um estudo realizado por Fieni *et al.* (2003), foi demonstrado que a presença de células infectadas pelo vírus da CAE no útero e oviduto sugerem uma potencial forma de transmissão vertical para o embrião ou feto. Porém sabe-se que, a placenta cotiledonária das fêmeas caprinas não permite o contato do feto com o sangue materno, mas pode existir uma transferência de células durante um processo inflamatório local, o qual pode acontecer durante a infecção viral. Blacklaws *et al.*

(2004) afirmam que a infecção transplacentária pode ocorrer em torno de 5-10% e que tem uma contribuição relativa na transmissão da enfermidade.

D) Transmissão Sexual

A detecção do vírus da CAE no sêmen de células livres como em células infectadas, sugerem a possibilidade de transmissão sexual. Essa observação sugere a preocupação com a reprodução natural e assistida com sêmen de machos soropositivos (PINHEIRO *et al.*, 2001; TRAVASSOS *et al.*, 1999). O sêmen de animais infectados pode abrigar o vírus, porém não há transmissão demonstrada por essa rota. Não existe nenhum estudo sobre a transmissão do vírus das fêmeas para os machos (BLACKLAWS *et al.* 2004).

2.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

O efeito da imunossupressão que os *Lentivirus* produzem no sistema imunológico do hospedeiro, leva a uma predisposição a contraírem outras doenças. Assim, o agravamento clínico da CAE causado pela depressão do sistema imunológico, pode levar a diversos problemas secundários como problemas de fertilidade, problemas de parto, diminuição de ganho de peso diário dos cabritos e formas agudas de mamite e pneumonia. O emagrecimento crônico pode manifestar-se em combinação com todas as formas clínicas, mas pode também aparecer sem acompanhar nenhum outro sintoma (FRANKE, 1998).

Outras infecções podem provocar a ativação do vírus da CAE quando latente, ativando células imunes do hospedeiro e levando a uma replicação viral acelerada (HARKISS, WATT, 1990). A resposta imune humoral não é importante na regulação de infecção persistente de monócitos em cabras clinicamente afetadas com o vírus da CAE (ELLIS, 1990).

Altos títulos de anticorpos para o vírus da CAE são direcionados para glicoproteínas do envelope viral (Env) em cabras infectadas que desenvolvem uma artrite progressiva (BERTONI *et al.*, 1994), todavia o tempo que se segue entre a infecção e o aparecimento de anticorpos no sangue que varia de semana a meses reflete o grau de replicação viral em cada animal (HARKISS, WATT, 1990).

A resposta humoral se direciona contra proteínas de superfície, porém os anticorpos produzidos tendem a ser pouco neutralizantes ou não neutralizantes (BERTONI *et al.*, 2000). A diversidade antigênica pode ser a responsável por este padrão de anticorpos (CHEVEERS *et al.*, 1993).

A infecção inicial estimula uma resposta imune sistêmica e local (articulação) para os antígenos virais. A incapacidade da resposta imune de eliminar todas as células infectadas resulta numa infecção viral persistente e no potencial para expressar antígenos virais em sítios específicos, correlacionados com a patogênese da doença, como o são as articulações (BERTONI *et al.*, 2000; MC GUIRE *et al.*, 1986). A memória imune responsável pela expansão e maturação de células B e produção de imunoglobulinas contribui para imunopatologia da artrite crônica (WILKERSON, *et al.*, 1995). A severidade da artrite em cabras cronicamente

infectadas, tem sido correlacionada com o anticorpo anti-gp 135 (glicoproteína de superfície) do vírus da CAE no fluido sinovial (PHELPS, SMITH, 1993).

A imunossupressão previne lesões causadas pelo vírus da CAE. Na maior parte destas lesões no líquido sinovial, encontra-se acúmulo de linfócitos, macrófagos e células do plasma. O aumento de anticorpos associado ao desenvolvimento da doença é apoiado pela observação que a vacinação contra o *Lentivírus* de animais podem causar efeitos clínicos adversos (BERTONI, *et al.*, 2000; MC GUIRE, 1987). Animais vacinados com o vírus inativado da CAE desenvolveram uma artrite mais severa (MC GUIRE *et al.*, 1986; RUSSO *et al.*, 1993).

2.7 DIAGNÓSTICO

2.7.1 Clínico

O diagnóstico clínico não é suficiente para sustentar um diagnóstico definitivo da CAE pela variação do seu quadro clínico e freqüente desenvolvimento sub-clínico da doença. A manifestação clínica mais freqüente é a artrite, e esse fato incentivou a formulação de um índice clínico. Seu cálculo consiste na diferenciação entre a medida da circunferência do joelho mais grosso e da canela (metacarpo) mais fina. Quando o resultado dessa medida é igual ou superior a 7, é caracterizado como artrite positiva (FRANKE, 1998). Todavia, este índice não indica se o animal está infectado com o vírus da CAE, ele informa apenas de forma imprecisa que o animal está com artrite, sendo que esta pode ser causada por uma série de agentes

infecciosos, como o *Mycoplasma*, fatores nutricionais e/ou traumáticos (FRANKE, 1998; GARCIA, 1993).

2.7.2 Laboratorial

2.7.2.1 Detecção Sorológica

Quando o diagnóstico de infecção para *Lentivirus* é realizado pela presença de anticorpos, é importante considerar o período retardado entre a infecção e soroconversão, e também a possibilidade de sororeação intermitente (HANSON *et al.*, 1996).

Na sorologia, um resultado negativo deve ser avaliado com cautela, pois pode ser que ocorra uma soroconversão tardia ou baixas concentrações de anticorpos no sangue (FRANKE, 1998), principalmente no caso da IDGA que é um teste com uma sensibilidade moderada quando comparado a outras técnicas (HANSON *et al.*, 1996).

A) Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

O teste sorológico mais empregado e oficialmente reconhecido para o vírus da CAE em vários países é a IDGA (FRANKE, 1998). É um teste realizado em placas de Petri utilizando um preparado purificado do vírus e soros-teste. Baseia-se na difusão do antígeno e anticorpo no gel de agarose, onde a reação antígeno-anticorpo forma uma linha de precipitação no gel visível a olho nu.

Para Abreu et al. (1998), na prova de diagnóstico para o vírus da CAE, o antígeno recomendável são as glicoproteínas e nucleoproteínas virais. No mercado é oferecido também, o antígeno do vírus Maedi-Visna (um *Lentivírus* de morfologia e bioquímica similar ao vírus da CAE). Na prática são utilizados os dois tipos de antígenos (KNOWELES *et al.*, 1994).

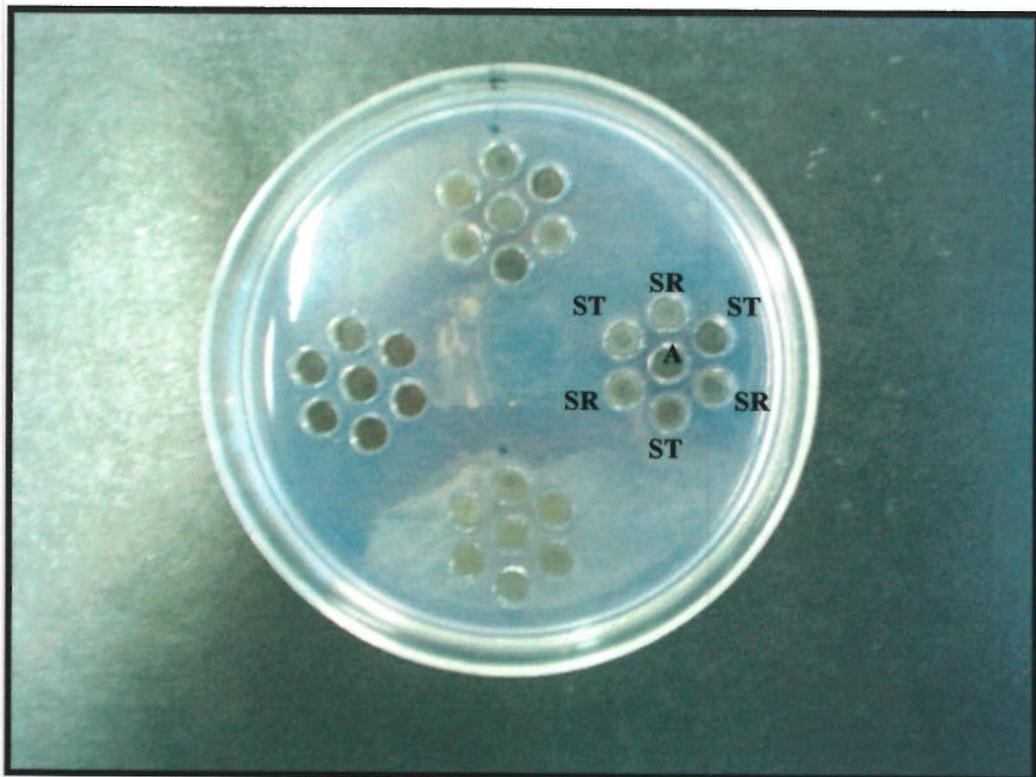


FIGURA 2. Placa de petri contendo gel de agarose para imunodifusão, perfurada para distribuição dos antígenos (A), soros-testes (ST) e soros-reagentes (SR).

B) Técnica Imunoenzimática (ELISA)

É uma técnica de grande sensibilidade, especificidade, e uso de rotina, pois permite o processamento e automação de um grande número de amostras.

Nessa técnica, os soros testes são adicionados ao antígeno viral fixado em uma placa de poliestireno. Para detectar a presença de anticorpos, é adicionado um anticorpo anti-cabra ou anti-ovino peroxidase marcado (HARKISS, WATT, 1990). Podem-se utilizar diferentes antígenos nessa técnica para pesquisa de anticorpos para o vírus da CAE, entre eles está o p25 (núcleo) e p40 (superfície) (CLAVIJO, THORSEN, 1995); antígeno protéico total do vírus (SIMARD *et al.*, 2001); proteínas recombinantes internas e de transmembrana como p17 e p18 (BABA *et al.*, 2000).

Segundo Ellis *et al.* (1983), cabras que foram inoculadas com o vírus da CAE produziram anticorpos no soro e reagiram no teste ELISA usando o vírus Maedi – Visna como antígeno. Foi relatado por Michal, Wojciech (2001), que a aplicação de testes sorológicos com o ELISA e métodos de biologia molecular dão um resultado seguro ao diagnóstico da CAE, e que a eficácia do ELISA comparada aos resultados com nested reação de cadeia de polimerase (PCR) com soro, revelou que o último poderia ser menos sensível.

C) Outras provas sorológicas

Para a detecção qualitativa de anticorpos contra as principais proteínas virais, tem-se recomendado a técnica de Western blotting (HARKISS, WATT, 1990). Outro teste sorológico desenvolvido foi o da imunofluorescência indireta, que em condições experimentais tem apresentado potencial como teste alternativo e complementar ao diagnóstico da CAE, além de recomendado pela OIE no diagnóstico da infecção (REISCHAH *et al.*, 2002).

2.7.2.2 Detecção do vírus ou componentes virais

A) Isolamento viral

O isolamento do vírus em cultivos celulares é uma técnica diagnóstica sensível e demonstra a presença do vírus. Entretanto é um diagnóstico demorado e, bastante dispendioso.

O isolamento viral a partir de células do sangue e tecidos se torna uma alternativa para o diagnóstico dos *Lentivírus*. Para o isolamento do vírus da CAE, obtêm-se células mononucleares do sangue periférico. Os monócitos infectados são então co-cultivados em células susceptíveis, como as da MSC, a fim de obter a infecção "*in-vitro*". O vírus presente nos monócitos infecta às células da MSC, que tipicamente formam abundantes estruturas sinciciais, depois de vários dias de infecção (TIGRE *et al.*, 2002).

B) Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A detecção do ácido nucléico do vírus da CAE baseia-se na detecção do vírus como provírus (DNA proviral) integrado ao genoma celular ou como vírus livre (RNA). A metodologia utilizada é a técnica de biologia molecular baseada na PCR que é uma importante ferramenta para o diagnóstico de infecções virais (HARKISS, WATT, 1990; TIGRE *et al.*, 2002).

A PCR é um método diagnóstico que combina sensibilidade e especificidade, capaz de identificar animais em estágios recentes da infecção ou que ainda não soroconverteram (REILLY, *et al.*, 2004; TIGRE *et al.*, 2002).

2.8 CONTROLE E PROFILAXIA

Infelizmente até o momento não existe possibilidade de tratamento para a CAE. Algumas vacinas já foram testadas, mas não conferiram proteção quando os animais foram desafiados com vírus infeccioso (RUSSO *et al.*, 1993). Caprinos vacinados desenvolvem a doença mais grave que os animais não-vacinados (REILLY, *et al.*, 2004).

Atualmente, os programas de controle ou erradicação do vírus da CAE têm sido adotados em vários países, baseando-se em testes periódicos dos animais, separação ou eliminação dos positivos, e uso de certas práticas de manejo para prevenção da disseminação do agente (OIE/FAO, 1997).

Como primeira medida para o controle, deve-se fazer o levantamento da situação do rebanho, através de exame sorológico; separar as crias imediatamente após o nascimento, evitando o contato com secreções e isolá-las dos adultos; administrar colostro termicamente tratado em banho-maria (56°C, +/- 2°C durante 60 minutos) de mães não infectadas ou de vaca, alimentar as crias com substitutos do leite; adotar linha de ordenha; controlar a monta com reprodutores positivos; e uso de material estéril, como seringas e agulhas, instrumentos cirúrgicos, tatuador entre outros. Desde que possível, não devem ser comprados animais que não estejam

acompanhados de atestados negativos para a CAE (CALLADO *et al.*, 2001; ELLIS *et al.*, 1983; FRANKE, 1998; GARCIA, 1993; HANSON *et al.*, 1996; NORD *et al.*, 1998; PERETZ *et al.*, 1994; REILLY, *et al.*, 2004).

No estabelecimento de programas de controle da CAE em caprinos deve-se estar atento para a introdução de reprodutores soropositivos ou do sêmen congelado, nos casos de propriedades que utilizam a inseminação artificial (PINHEIRO *et al.*, 2001). O efeito de medidas preventivas só pode ser observado após um ano de aplicação, por causa do longo tempo entre a contaminação e a soroconversão (PERETZ *et al.*, 1994).

2.9 SITUAÇÃO NO BRASIL

Em 1989 foi descrito o primeiro isolamento do vírus no Brasil, que ocorreu no Rio Grande do Sul (HOTZEL *et al.*, 1993). Até o desenvolvimento da caprinocultura leiteira nacional, quadros clínicos sugestivos de CAE não haviam sido descritos no Brasil. Observou-se então que os países exportadores apresentavam um elevado percentual de animais sorologicamente positivos às lentivirose. A importação de caprinos por diversos estados seguidos da movimentação interna entre os mesmos podem ter servido como vias de contaminação dos plantéis.

Verificou-se que as lentivirose de pequenos ruminantes já se encontram disseminado nas várias regiões do Ceará (PINHEIRO, *et al.*, 2001). Em um inquérito sorológico realizado no Rio de Janeiro para a o vírus da CAE, foi indicado que ele está presente e bem disseminado no referido estado (CUNHA, NASCIMENTO,

1995). Na Bahia, foi relatado por Fitterman (1988) a primeira constatação sorológica da CAE em um plantel caprino, e o primeiro isolamento viral do estado foi realizado por Tigre, *et al.*, (2002) através do cultivo de macrófagos e cultivos primários de células de membrana sinovial.

Para Saraiva Neto *et al.* (1995), a frequência de animais soropositivos foi maior nos animais puros que mestiços, e que adultos também apresentam uma prevalência maior da enfermidade que os jovens, em rebanhos caprinos leiteiros no estado de Pernambuco testados pela IDGA. Castro *et al.* (2002) através de exames sorológicos para a CAE no Brasil afirma que os animais mostraram soroconversão progressiva, com uma taxa maior a partir do início da reprodução até a última metade da lactação, e foi caracterizada também uma alta variabilidade individual.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi utilizar células da MSC infectadas com o vírus da CAE como antígeno viral para detecção de anticorpos contra o vírus, em um teste imunoenzimático (ELISA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

→ Comparação com o teste sorológico IDGA.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR DA MEMBRANA SINOVIAL DE CABRA (MSC)

Os cultivos de membrana sinovial, utilizados para replicação viral, foram obtidos a partir do explante das membranas sinoviais da articulação intercarpal de ambos os membros anteriores de cabritos, recém nascidos, confirmadamente negativos pelo teste de PCR.

A técnica utilizada para obtenção dos cultivos primários seguiu o protocolo anteriormente descrito por Abreu *et al.* (1998). Após a remoção dos tecidos periarticulares, as cavidades articulares foram abertas, e as membranas sinoviais delicadamente dissecadas, umedecidas com Meio Essencial Mínimo – Glasgow (MEM-G) e seccionadas em fragmentos de aproximadamente 1,0 mm os quais foram distribuídos em garrafas para o cultivo de células (25 cm³) (FALCON) e incubadas a 37 ° C. Após 30 minutos, foram adicionados 2,0 ml de MEM-G suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (GIBCO BRL) 100 UI penicilina G sódica, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina e 0,25 µg/ml de anfotericina B (FUNGIZONE-GIBCO BRL). Após 15 a 20 dias de incubação, os explantes e as monocamadas foram tripsinizadas (Tripsina 1:250 GIBCO) e subcultivadas para a obtenção de monocamadas celulares.

4.2 VÍRUS

O vírus utilizado foi a cepa DECENTE do vírus da CAE (isolamento de campo). Para a replicação viral foram utilizados cultivos de MSC os quais foram infectados e mantidos com MEM-G e 2% de SFB inativado a 37°C até o aparecimento do efeito viral (7-15 dias). Os cultivos de MSC infectados foram congelados/descongelados e centrifugados a 10000rpm durante 30 minutos, 4°C.

Ao sobrenadante do vírus, obtido, foi adicionado polietilenoglicol 8000 (PEG, Sigma) numa concentração de 8% e cloreto de sódio a 2,3% (NaCl, Sigma), e sob agitação constante a 4°C durante toda a noite. Esse material foi centrifugado a 10000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o vírus precipitado foi ressuspensão em 10% do volume inicial em NET (Tris HCl 50mM, EDTA 1mM e Cloreto de Sódio 100mM), centrifugado novamente durante 20 minutos a 5000g e o sobrenadante foi congelado a -20°C para posterior ultracentrifugação.

O volume viral obtido na fase de concentração (100X) foi submetido a uma ultracentrifugação a 42 Ti (Beckman), por 2 horas e 30 minutos, a 4°C. O pellet obtido foi ressuspensão em uma solução NET (10X do volume inicial) e congelado.

4.3 OBTENÇÃO DE SORO HIPERIMUNE DE COELHO

Para a produção de soro hiperimune contra o vírus da CAE, imunizou-se coelhos New Zeland adultos. O vírus concentrado e ultracentrifugado foi inoculado em quatro doses de 50µg a cada 20 dias, emulsificado com 500µl de adjuvante completo de Freund (Sigma) na primeira imunização (inoculação intramuscular) e

nas subseqüentes com adjuvante incompleto de Freund (Sigma) (inoculação subcutânea).

O soro hiperimune de coelho foi incubado com células de MSC a 4°C por toda a noite e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido 3 vezes e o sobrenadante foi coletado.

4.4 PRODUÇÃO DE ANTIGENO VIRAL PARA O TESTE DE ELISA

Após a infecção das células de MSC contidas em garrafas tipo ROUX e o aparecimento do efeito citopático, as garrafas foram congeladas (rompimento celular e melhor liberação do vírus). Em seguida, essas garrafas contendo células da MSC infectadas foram descongeladas e o seu material foi centrifugado a 10000 rpm durante 30 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado para novas infecções e posteriores centrifugações e o pellet de células infectadas foi ressuspenso em 10 vezes do volume original para ser utilizado como antígeno viral.

4.5 TITULAÇÃO DO ANTÍGENO VIRAL

A placa de poliestireno de 96 poços foi sensibilizada com diluições seriadas do antígeno viral em tampão carbonato-bicarbonato, e incubada toda a noite a 4 C. Passado esse período, os poços foram lavados 5 vezes com uma solução de PBS-Tween 20 0,05%, e incubados novamente, durante 1 hora e 30 min. a 37°C, com solução de PBS leite a 5% para fazer o bloqueio de sítios livres reativos. Em seguida, foram adicionado aos poços soro hiperimune de coelho na diluição de 1:2000 em solução de PBS leite a

4.7 DETECÇÃO SOROLÓGICA POR IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE (IDGA)

O teste sorológico de IDGA foi realizado com um "kit" de uso comercial ("Biovetech") seguindo-se as orientações do fabricante. Este teste utiliza um antígeno específico do vírus da CAE que é a proteína do capsídeo (p-28).

Inicialmente coloca-se o gel de agarose do "kit" em banho-maria para torná-lo líquido. Distribuiu-se 15 ml de gel por placa de petri (90mm) e, após solidificação do gel, colocou-se na geladeira por 24 hs. Utilizando-se as recomendações do fabricante, perfura-se o gel cuidadosamente. Foram distribuídos os soros dos animais, os soros controle e o antígeno, nos poços correspondentes. As placas de petri foram incubadas em câmara úmida, à temperatura de 20-25° C. A primeira leitura foi feita às 24 horas, e após 48 horas realizou-se a leitura confirmatória. A interpretação dos resultados é demonstrada na figura 3:

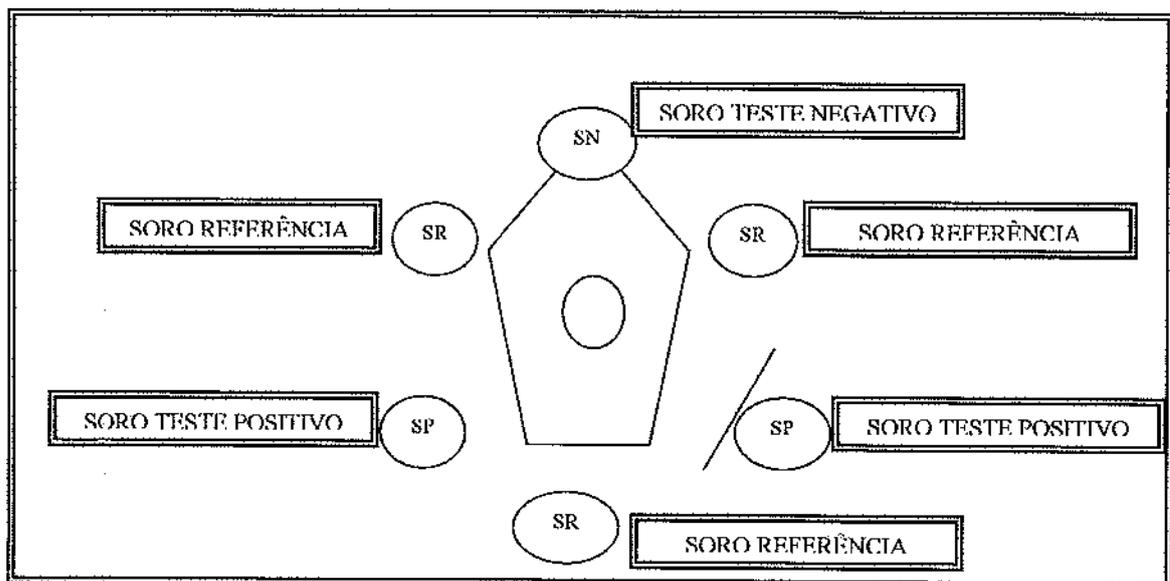


FIGURA 3. Figura esquemática das reações com os soros negativos e positivos visualizados no teste de Imunodifusão em Gel de Agarose

4.8 DETECÇÃO SOROLÓGICA POR TESTE IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A placa de poliestireno de 96 poços foi sensibilizada com o antígeno viral diluído em 1:50 em tampão carbonato-bicarbonato, e incubada toda a noite a 4° C. Passado esse período, os poços foram lavados 5 vezes com uma solução de PBS-Tween 20 0,05%. Posteriormente foi adicionado uma solução de PBS leite a 5% para fazer o bloqueio de sítios livres reativos e incubados novamente, durante 1 hora e 30 min. a 37°C. Em seguida, foram adicionados aos poços os soros testes dos animais na diluição de 1:50 em solução de PBS leite a 0,5% + tween 20, e a placa foi novamente incubada por 1 hora e 30 min. a 37°C. Passado esse período, os poços foram lavados 5 vezes com uma solução de PBS-Tween 20 0,05% e incubados novamente, durante 1 hora a 37°C, com anticorpo anti-IgG de cabra marcado com peroxidase (Sigma), diluído em PBS leite a 0,5% + tween 20. Depois de lavados como mencionado anteriormente, a revelação da reação foi realizada com substrato de TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenidine) em presença de H₂ O₂ (10ml/10µl) e a leitura em espectrofotômetro com filtro de 630nm após 10 minutos.

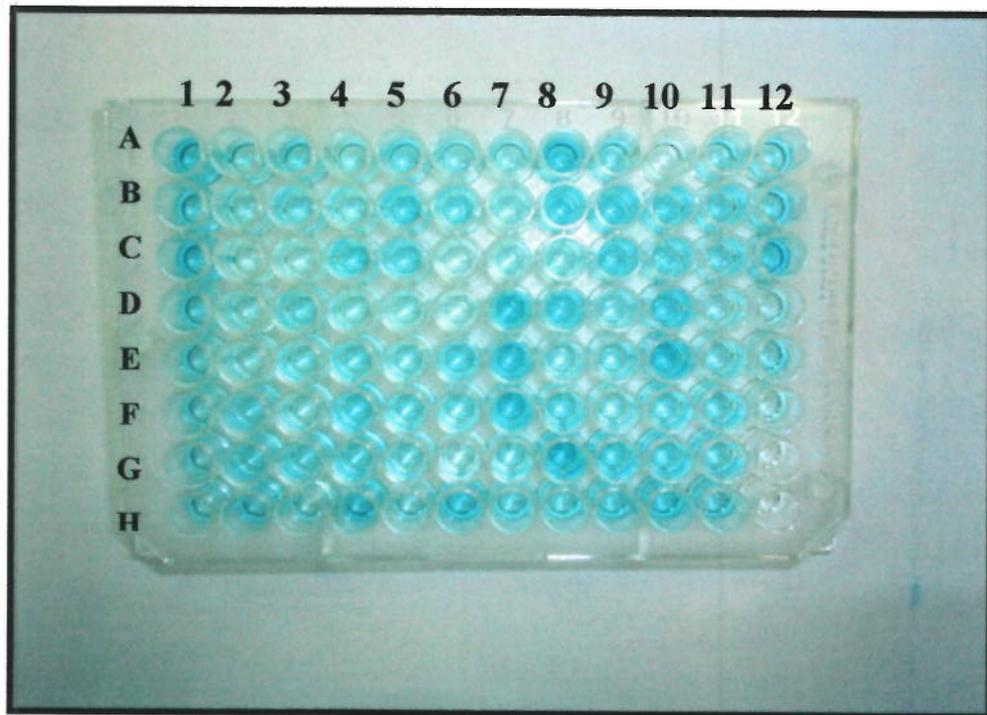


FIGURA 4: ELISA de captura. Sensibilizou-se as placas com pellete de células de MSC infectadas (1:50), adicionou-se os soros-testes (1 a 12E), soro-controle positivo (4H), soro-controle negativo (4D), controle de soro (12F), controle de conjugado (12G) e controle de substrato (12H) e, posteriormente, os conjugados anti-cabras marcados com peroxidase. A reação foi revelada com uma solução de TMB e lida em espectrofotômetro.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O valor do ponto de corte ou "cutoff" foi realizado segundo Frey, *et al.*(1998). O índice *Kappa* foi calculado para determinar a correlação de ambas as técnicas (THRUSFIELD, 1995).

5. RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-VÍRUS DA CAE PELO IDGA

Os resultados obtidos através da reação de IDGA para detecção de anticorpos anti-vírus da CAE podem ser observados na figura 5. Das 100 amostras analisadas por esta técnica, 24 apresentaram soropositividade e 76 foram soronegativas. Estes resultados foram a base para a escolha dos animais sorologicamente positivos e negativos a serem utilizados no futuro experimento de padronização do ELISA.

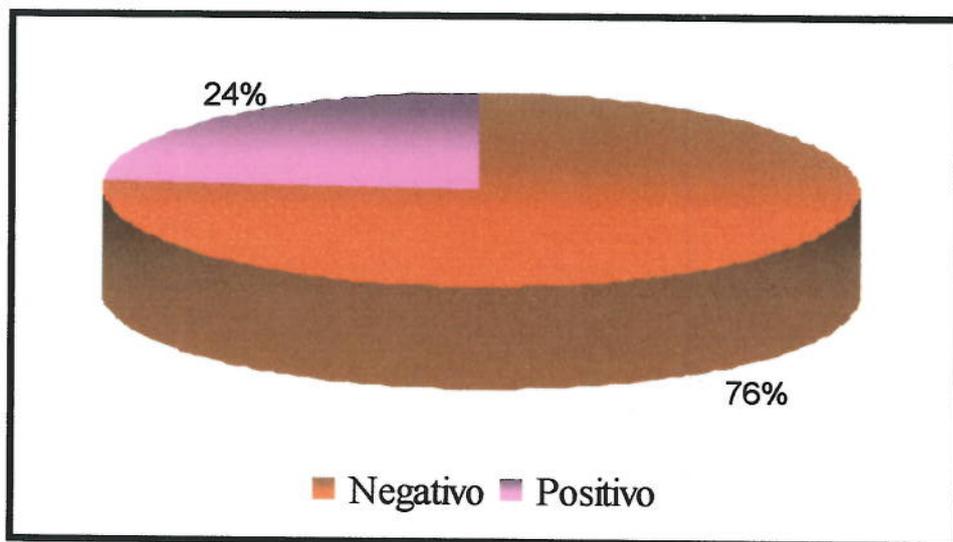


FIGURA 5. Resultados obtidos através da técnica de IDGA para detecção de anticorpos anti-vírus da CAE em 100 soros no estado da Bahia.

5.2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- VÍRUS DA CAE POR ELISA

As amostras foram consideradas positivas (+) quando apresentaram cutoff superior a 0, 252. Segundo FREY *et al.*(1998), o cálculo do cutoff é feito da seguinte maneira:

Cutoff = $X + SDf$, onde:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (xi - x)^2}{(n-1)}}$$

X = média dos soros controles independentes

xi = soro controle individual

n = número de soros controles independentes

$f = t \sqrt{1 + \frac{1}{n}}$, que já tem seus valores de confiança calculados de acordo

com o número de soros controles usados e do índice de confiança (tabela 1, FREY *et al.*, 1998). Neste trabalho utilizou-se o índice de confiança de 95%.

Como mostra a figura 6, do total de 100 amostras de soro, o teste imunoenzimático ELISA detectou a presença de anticorpos em 43 amostras, enquanto que as 57 restantes foram negativas.

A tabela 1 mostra os resultados destas 100 amostras de soros analisadas através de IDGA e ELISA. Ao analisar comparativamente os resultados obteve-se que 21 amostras (21%) positivas para o ELISA correspondem a animais sorologicamente positivos por IDGA e que 3 amostras (3%) não foram ELISA positivos, apesar de se apresentarem assim no IDGA. Entretanto a técnica de ELISA detectou anticorpos em 22 amostras que foram negativas para o IDGA.

Na figura 4 pode-se observar uma placa de ELISA. Nas amostras positivas, vê-se a coloração azul mais acentuada.

A análise estatística demonstrou que os testes de ELISA e IDGA tiveram uma concordância moderada ($k= 0,464$).

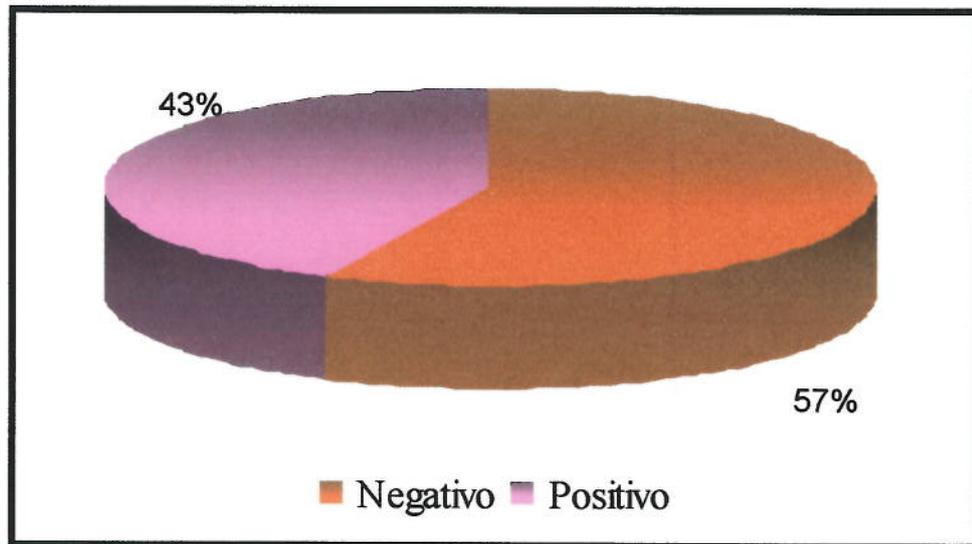


FIGURA 6. Resultados obtidos através da técnica de ELISA para detecção de anticorpos anti – vírus da CAE em 100 amostras se soro.

TABELA 1. Comparação dos resultados obtidos através da técnica do teste imunoenzimático – ELISA em amostras de soro e por IDGA

	IDGA		TOTAL
	+	-	
ELISA +	21	22	43
ELISA -	3	54	57
TOTAL	24	76	100

* Índice Kappa : 0,464 – concordância moderada (THRUSFIELD, 1995).

6. DISCUSSÃO

Como alguns animais podem apresentar baixos títulos de anticorpos, soroconversão tardia, ou ainda reações intermitentes de soropositividade e soronegatividade, o diagnóstico sorológico de animais infectados pelo vírus da CAE exige provas mais sensíveis (CLAVIJO, THORSEN, 1995; EAST, *et al.*, 1993; HANSON, *et al.*, 1996; PHELPS, SMITH, 1993). Apesar da sorologia por IDGA ser uma técnica de referência para o diagnóstico do vírus da CAE, é uma prova de baixa sensibilidade; entretanto é o teste mais amplamente utilizado no diagnóstico de infecções por *Lentivirus* em animais (ABREU *et al.*, 1998; KNOWLES *et al.*, 1994).

O vírus da CAE tem várias vias de transmissão e sua disseminação acontece facilmente no rebanho, dessa maneira diagnosticar e separar os animais sorologicamente infectados contribui para erradicação do vírus no rebanho (CALLADO, *et al.*, 2001). Assim, a utilização de provas sorológicas mais sensíveis aos anticorpos, como teste imunoenzimático – ELISA tem um valor particular na identificação de animais infectados com baixos títulos de anticorpos. A estratégia utilizada na técnica do ELISA combina a utilização de um antígeno viral para identificação de anticorpos contra o vírus. Na realização da técnica é necessário um antígeno viral, um anticorpo anti-cabra marcado e um substrato. Ela demonstra especificidade e sensibilidade para detectar um maior número de amostras positivas por provas sorológicas, para o vírus da CAE.

Na realização desse trabalho, foi utilizada a técnica do teste ELISA como prova sorológica mais sensível na detecção de anticorpos pelo vírus da CAE.

Na primeira parte deste trabalho foi realizado um levantamento sorológico pela técnica de IDGA, onde esta mostrou uma prevalência de 24% dos animais positivos a infecção pelo vírus da CAE. Estes animais estavam aparentemente saudáveis e não possuíam sintomatologia evidente. Esta técnica sorológica, normalmente é aplicada para uma triagem do rebanho, detectando animais portadores do vírus. Entretanto, esse diagnóstico sorológico pode complicar-se devido à presença de animais com baixos títulos de anticorpos, resultando na presença de falso-negativos no rebanho. Considerando a necessidade de provas mais sensíveis e identificando assim maior número de animais sem sintomatologia para evitar a disseminação do vírus, utilizamos a técnica de ELISA para detectar a presença de anticorpos contra o vírus da CAE no soro.

Para realização do ELISA, foi produzido um antígeno viral. Este foi obtido através do pellet de células da MSC infectadas, mostrando-se eficiente para se ligar aos anticorpos presentes no soro dos animais infectados.

Esse antígeno viral antes de ser utilizado na detecção de anticorpos contra o vírus da CAE no teste imunoenzimático (ELISA), foi titulado usando soro hiperimune de coelho na diluição de 1:2000 com tampão carbonato – bicarbonato, e obteve-se uma densidade óptica satisfatória a uma diluição de 1:50 (0,750) o que demonstra que esse pellet de células da MSC infectadas funcionou satisfatoriamente como antígeno viral.

Através da técnica de ELISA, detectou-se em 22% dos animais soronegativos por IDGA, a presença de anticorpos no soro. Estes achados confirmam que animais que apresentam baixos títulos de anticorpos podem não ser detectados pelo IDGA permanecendo como falso-negativos no rebanho e são fonte de disseminação da CAE. O uso de uma técnica sorológica de baixa sensibilidade como a IDGA dificulta a identificação desses animais (HARKISS, WATT, 1990). Além de que, o ELISA permite processar uma grande quantidade de soros em uma placa de poliestireno de 96 poços, tornando-se mais prática e com melhor custo-benefício, não esquecendo de citar que a sua maior sensibilidade e a identificação de um maior número de animais portadores do vírus, permite medidas de controle mais eficazes e erradicação da doença.

As provas sorológicas IDGA e ELISA tiveram concordância moderada (0,461) quando comparadas através do índice *KAPPA*, com uma maior sensibilidade para detecção de anticorpos contra o vírus da CAE no ELISA, como era esperado.

Concluindo, no presente estudo foi utilizado células da MSC infectadas com o vírus da CAE como antígeno viral para detecção de anticorpos contra o vírus, em teste ELISA, onde foi produzido um antígeno viral a partir do pellet e células da MSC; Foi realizado a sua titulação. Por outro lado compararam-se as provas sorológicas IDGA e ELISA, demonstrando nesta a maior eficiência na detecção de anticorpos contra o vírus da CAE. Os resultados obtidos demonstram que o ELISA pode representar uma importante ferramenta diagnóstica para a CAE, já que permite o processamento de um grande número de amostras e disponibiliza

técnicas mais sensíveis, imprescindíveis à caprinocultura baiana. Contudo, são necessários estudos complementares, com um valor amostral maior, comparação com outras técnicas diagnósticas, elevando assim a sensibilidade da técnica e favorecendo o bem-estar animal.

7. CONCLUSÕES

- 1) Animais sadios soronegativos em testes sorológicos podem ser portadores do vírus e fonte de infecção de doenças infecciosas em um rebanho;
- 2) Animais sorologicamente positivos pela IDGA, podem ser considerados infectados sem a necessidade da confirmação da presença viral;
- 3) O uso de pellet de células da MSC infectadas como antígeno viral pode ser utilizado na detecção de anticorpos contra o vírus da CAE.
- 4) O teste imunoenzimático – ELISA, é uma prova sorológica que mostrou nos testes realizados uma avaliação sorológica de maior positividade ou superior que os demonstrados no IDGA.
- 5) O ELISA é prático, representa uma importante ferramenta no diagnóstico da CAE, se disponibilizando com técnica de sensibilidade satisfatória.
- 6) A preocupação com o rebanho de caprinos no Nordeste, incentiva as pesquisas relacionadas à sanidade animal, demonstrando a necessidade de adoção de medidas sanitárias eficientes e que se baseiem em diagnósticos laboratoriais para o controle e a prevenção desta enfermidade que provoca impacto econômico nos rebanhos.

8. REFERÊNCIAS

- ABREU, S.R.O.; CASTRO, R.S.; NASCIMENTO, S.A.; SOUZA, M.G. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesq. Vet. Brás.** v.18, n.2, p.57-60, 1998.
- ADAMS, D.S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J.L.; McGUIRE, T.C.; GORHAM, J.R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.44, p.1670 – 1675, 1983.
- BABA, S.S.; FOTABE, A.I.; BABA, M.M.; RIMSTAD, E. Preliminary survey for antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) using recombinant GAG proteins: studies among small ruminant populations in north-eastern Nigeria. **Small Ruminant Research**, v.37, p.137-140, 2000.
- BERTONI, G.; ZAHNO, M.; ZANONI, R.; VOGT, H.; PETERPHANS, E.; RUFF, G.; CHEVEERS, W.P.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. **Journal of Virology**, v.68, n.11, p.7139 – 7147, 1994.
- BERTONI, G.; HERTIG, C.; ZAHNO, M.; VOGT, H.; DUFOUR, S.; CORDANO, P.; PETERPHANS, E.; CHEEVERS, W.P.; SONIGO, P.; PANCINO, G. B. Cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprien arthritis-encephalitis virus and antibody response in infected goats. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.2929 – 2940, 2000.
- BLACKLAWS, B.A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N.J.; ANDRES, D.de; KLEIN, D.; HARKISS, G.D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v.101, p.199-201, 2004.
- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesq. Vet. Brás.**, v.21, p. 87-97, 2001.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; AZEVEDO, E.O.de; RESENDE, M.; GOUVEIA, A.M.G. Seroconversion and seroreactivity patterns of dayry goats naturally exposed to caprine arthritis-encephalitis virus in Brazil. **Ciência Rural Veterinária**, v.32, p.603-607, 2002.
- CHEVEERS, W.P.; Mc GUIRE, T.C.; NORTON, L.K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES, D.P.; Failure of neutralizing antibody to regulate CAE Lentivirus expression in vivo. **Virology**, v.196, n.2, p.835-839, 1993.
- CLAVIJO A.; THORSEN, J. Chemiluminescent detection of caprine arthritis-encephalitis virus with a PCR – generated single stranded nonradiolabelled probe. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.295-305, 1995.

- COOFIN, J.M. Retroviridae : the viruses and their replication. In: FIELDS, B. et al., **Virology**, 4th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2001. v.2. p.1767-1830.
- CUNHA, R.G.; NASCIMENTO, M.D.do. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do estado do Rio de Janeiro. **R. Bras. Med. Vet.**, v.17, n.2, p.72-75, 1995.
- EAST, N.E.; ROWE, J.D.; DAHLBERG, J.E.; THEILEN, G.H.; PEDERSEN, N.C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v.10, p.251-262, 1993.
- ELLIS, T.; ROBINSON, W.; WILCOX, G. Characterisation, experimental infection and serological response to caprine retrovirus. **Aust. Vet. J.**, v.60, n.11, p.321-326, 1983.
- ELLIS, T.; ROBINSON, W.; WILCOX, G. Effect of colostrum deprivation of goat kids on the natural transmission of caprine retrovirus infection. **Aust. Vet. J.**, v.60, n.11, p.326-329, 1983.
- ELLIS, T.M. Blood leukocyte infection rates in caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. **Aust. Vet. J.**, v.67, n.8, p.302-303, 1990.
- FIENI, F.; ROWE, K.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v.59, p.1515-1523, 2003.
- FITTERMAN, I.R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no estado da Bahia. In: **XXI Congr. Méd. Vet.**, p. 33 (resumo), 1988.
- FRANKE, C.R. In: **Controle sanitário da artrite-encefalite caprina**. Salvador : EDUFBA, 1998. 71p.
- FREY, A.; CANZIO, J.D.; ZURAKOWSKI, D. A Statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v.221, p.35-41, 1998.
- GARCIA, M. Artrite-encefalite caprina: uma nova doença no Brasil. **A Hora Veterinária**, v.76, p.57-59, 1993.
- GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P.G.E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J.E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increased during maturation of monocytes to macrophages. **J. Virol.**, v.58, n.1, p.67-74, 1986.
- GUEDES, M.I.M.C.; SOUZA, J.C.A.; GOUVEIA, A.M.G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v.53, n.1, p.15-22, 2001.

- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Acta. Vet. Scand.**, v.37, p.31-39, 1996.
- HARKISS, G.D.; WATT, N.J. Lentivirus infections and their detection. **Goat. Vet. Soc. J.**, v.11, n.1, p.19-25, 1990.
- HÖTZEL, I.; BASTOS, E.de S.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Caprine arthritis-encephalitis vírus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.26, p.1175-1179, 1993 .
- HULLINGER, G.A.; KNOWLES, D.P.; Mc GUIRE, T.C.; CHEEVERS, W.P. Caprine arthritis-encephalitis Lentivirus SU is the ligand for infection of caprine sinovial membrane cells. **Virology**, v.192, p.328-331, 1993.
- HUSO, L.D.; NARAYAN, O.; HART, W.G. Sialic acids the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **J. Virol.**, v.72, p.1974-1980, 1988.
- KNOWLES, D.P. Jr.; EVERMANN, J.F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H.M.; CHEEVERS, W.P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.243-245, 1994.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v.79, p.165-172, 2001.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Virus Res.**, v.87, n.1, p.69-77, 2002.
- LERONDELLE, C.; FLEURY, C.; VIALARD, J. La glande mammaire: organe cible de l' infection par le virus de l' arthrite et de encéphalite caprine. **Ann. Rech. Vet.**, v.20, p.57-64, 1989.
- LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J.F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Vet. Res.**, v.30, n.5, p.467-474, 1999.
- LIMA, P.P.; ROCHA, M.A.; STANCEK, D.; GOUVEIA, A.M.G.; OLIVEIRA, G.D.R. Vírus da artrite-encefalite caprina : isolamento e caracterização de parte do gene gag. **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.**, v.56, n.2,p.23-28, 2004.
- Mc GUIRE, T.C.; ADAMS, D.S.; JOHNSON, G.C.; KLEVJER- ANDERSON, P.; BARBEE, D.D.; GORHAM, J.R. Acute arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus challenge exposure of vaccinated or persistently infected goats. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, n.3, p.537-541, 1986.

- Mc GUIRE, T.C. The immune response to viral antigens as a determinant of arthritis in caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.17, p.465-470, 1987.
- MICHAL R.; WOJCIECH. Preliminary results of comparasion of ELISA and PCR methods in the dianosis of caprine arthritis-encephalitis virus infection. Disponível em: <http://www.google.com/search?q=cache:M3VLT.../art10500.htm+CAEV+AND+PCR&HL=P>
Acesso em: 31 de jan. 2001.
- MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.DU. J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J.F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. **Virology**, v.259, p.67-73, 1999.
- MURPHY, F.A.; GIBBIS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. Retroviridae. In: _____ **Veterinary virology**. 3 ed. USA : Academic Press, 1999. p. 363-389.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; CORK, L.C.; GRIFFIN, D.E. Biological Characterization of the Virus Causing Leukoencephalitis and Arthritis in Goats. **J. Gen. Virol.**, v.5, p.69-79, 1980.
- NARAYAN, O. WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; GRIFFIN, D.E.; CORK, L.C. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **J. Gen. Virol.**, v.59, n.2, p.345-356, 1982.
- NORD, K.; HOLSTAD, G.; EIK, L.O.; GRONSTOL, H. Control of caprine arthritis-encephalitis virus and corynebacterium pseudotuberculosis infection in a Norwegian goat herd. **Acta Vet. Scand**, v.39, p.109-117, 1998.
- OIE/FAO. Animal health yearbook. 36 FAO, 1997.
- PERETZ, G.; BUGNARD, F.; CALAVAS, D. Study of prevention programmme for caprine arthritis-encephalitis. **Vet. Res.**, v.25, p.322-326, 1994.
- PHELPS, S.L.; SMITH, M.S. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. **JAVMA.**, v.203, n.12, p.1663 – 1668, 1993.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.3, p.449 – 454, 2001.
- PYPER, J.M.; CLEMENTS, J.E.; GONDA, M.A.; NARAYAN, O. Sequence homology between cloned caprine arthritis-encephalitis virus and visna virus, two neurotropic lentiviruses. **J. Virol.**, v.58, n.2, p.665-670, 1986.
- REILLY, L.K.; BAIRD, A.N.; PUGH, D.G. Enfermidades do Sistema Musculoesquelético. In: _____. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. p.251-286.

REISCHAK, D.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesq. Vet. Brás.**, v.22, p.7-12, 2002.

ROLLAND, M.; CHAUVINEAU, C.; VALAS, S.; MAMOUN, R.Z.; PERRIN, G. Establishment and characterization of a goat synovial membrane cell line susceptible to small ruminant lentivirus infection. **Journal of Virological Methods**, p.1-8, 2004.

RUSSO, P.; VITU, C.; FONTAINE, J.J. VIGNONI, M. Caprine arthritis-encephalitis: trial of an adjuvant vaccine preparation. I. Clinical and virological study. **Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.**, v.16, n.2, p.131-136, 1993.

SARAIVA NETO, A.O.; CASTRO, R.S.; BIRGEL, E.H.; NASCIMENTO, S.A. Estudo soro-epidemiológico da artrite-encefalite caprina em Pernambuco. **Pesq. Vet. Brás.** v.15, p.121-124, 1995.

SERAKIDES, R.; NUNES, V.A., PEREIRA, M.F. Estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAE). **Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.** v.48, n.4, p.415-424, 1996.

SIMARD, C.; KIBENGE, M.T.; SINGH, P.; DIXON, P. Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diag. Immunol.**, v.8, n.2, p.352-356, 2001.

THRUSFIELD, M. Diagnostic testing. In:_____.**Veterinary epidemiology**. 2º ed. Edt. Blackwell Science Ltd., 1995, p. 280-282.

TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I. Isolamento do vírus da artrite-encefalite caprina em cabras do estado da Bahia. In: FeSBE, 2002, Salvador. **Anais...** Salvador, 2002.

TRAVASSOS, C.E.; BENOIT, C.; VALAS, S.; da SILVA, A.G., PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis vírus in sêmen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v.32, p.101-106, 1999.

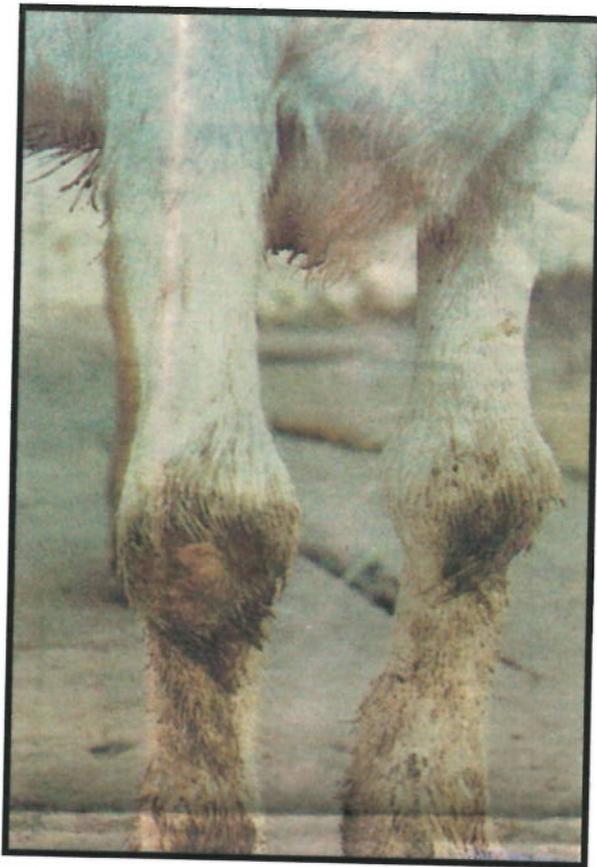
WILKERSON, M.J.; DAVIS, W.C.; BASZIER, T.V.; CHEEVERS, W.P. Immunopathology of chronic Lentivirus-induced arthritis. **American Journal of Pathology**, v.146, p.1433-1443, 1995.

ZINK, M.C.; NARAYAN, O; KENNEDY, P.G.E.; CLEMENTS, J.E. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: New leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. **Vet. Immunol. And Immunopathol.**, v.15, p.167-180, 1987.

ZINK, M.C.; NARAYAN, O. Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Virol.**, v.63, n.6, p.2578-2584, 1989.

ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; MYERS, J.D. Pathogenesis of caprine arthritis-encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissue of infected goats. **Am. J. Pathol.**, v.136, n.4, p.843-854, 1990.

ANEXO



ARTICULAÇÃO CARPO-METACARPIANA DE UM CAPRINO ACOMETIDO PELO VÍRUS DA CAE (Jornal A TARDE - Rural - 26/04/1999).

APÊNDICE

VALORES DAS LEITURAS ÓPTICAS DOS SOROS-TESTES EM ESPECTOFOTÔMETRO A 630NM.

SOROS TESTE	Leitura do ELISA	SOROS TESTE	Leitura do ELISA	SOROS TESTE	Leitura do ELISA
1	0,526	48	0,624	95	0,092
2	0,281	49	0,148	96	0,266
3	0,531	50	0,099	97	0,288
4	0,229	51	0,097	98	0,178
5	0,151	52	0,510	99	0,173
6	0,238	53	0,287	100	0,165
7	0,116	54	0,285		
8	0,384	55	0,119		
9	0,243	56	0,159		
10	0,157	57	0,284		
11	0,113	58	0,314		
12	0,217	59	0,127		
13	0,215	60	0,442		
14	0,481	61	0,115		
15	0,210	62	0,454		
16	0,347	63	0,348		
17	0,194	64	0,126		
18	0,176	65	0,114		
19	0,138	66	0,351		
20	0,391	67	0,507		
21	0,213	68	0,132		
22	0,305	69	0,144		
23	0,222	70	0,106		
24	0,121	71	0,251		
25	0,165	72	0,179		
26	0,217	73	0,342		
27	0,550	74	0,158		
28	0,199	75	0,228		
29	0,463	76	0,340		
30	0,358	77	0,321		
31	0,200	78	0,332		
32	0,506	79	0,279		
33	0,258	80	0,406		
34	0,342	81	0,149		
35	0,367	82	0,266		
36	0,294	83	0,277		
37	0,221	84	0,148		
38	0,249	85	0,252		
39	0,189	86	0,399		
40	0,144	87	0,270		
41	0,099	88	0,308		
42	0,163	89	0,233		
43	0,091	90	0,229		
44	0,081	91	0,276		
45	0,206	92	0,113		
46	0,149	93	0,179		
47	0,102	94	0,426		