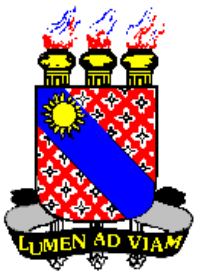

Universidade Estadual do Ceará

Tânia Valeska Medeiros Dantas

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE MAEDI-VISNA VÍRUS DE OVINOS.

Fortaleza – Ceará

2004

Universidade Estadual do Ceará
Tânia Valeska Medeiros Dantas

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE MAEDI-VISNA VÍRUS EM OVINOS.

Dissertação apresentada 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.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade em Pequenos Ruminantes.

Orientadora: Maria Fátima da Silva Teixeira.

Fortaleza – Ceará
2004

Universidade Estadual do Ceará
Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de Maedi-Visna Vírus em ovinos.
Autora: Tânia Valeska Medeiros Dantas

Defesa em 16/12/2004 Conceito obtido: Satisfatório

Banca Examinadora

_____
Maria Fátima da Silva Teixeira, Profª. Drª.
Orientadora

_____
Raymundo Rizaldo Pinheiro, Prof. Dr.
Co-Orientador/Examinador

_____ _____
Benito Soto Blanco, Prof. Dr
Examinador

José Albérsio de A. Lima, Prof. Dr.
Examinador

A esperança adquire-se. Chega-se à esperança através da verdade, pagando o preço de repetidos esforços e de uma longa paciência. Para encontrar a esperança é necessário ir além do desespero. Quando chegamos ao fim da noite, encontramos a aurora.

(Georges Bernanos)

DEDICATÓRIA

A Deus, por nunca me abandonar e ser meu ponto de apoio.

A minha mãe, Keillak Dantas, pela força e dedicação, e por sempre me apoiar em todos os momentos. Amo você

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida.

À minha mãe, Keillak Dantas, pelo apoio, compreensão e amor.

Aos meus irmãos, Ketheleen Dantas e Diego Maxwell, por serem meus irmãos e me fazerem feliz. Amo vocês

A Roberto Santos, meu namorado, que sempre me apoiou e deu força, pelo carinho, compreensão e paciência. Amo você

Ao Prof. Dr. Rizaldo Pinheiro, pela valiosa orientação, dedicação e esforço na realização da dissertação, assim como agradeço pela confiança.

A profª.drª. Fátima Teixeira, pela orientação, confiança, pelas lições de vida e amizade.

As minhas grandes amigas, Adriana Santos, Suzana Araújo e Michelline Maciel, por ser amiga, compreensivas, cheia de vida, maravilhosas e por sempre estarem presente em todos os momentos.

A Ana Cristina, pelos momentos de convivência, longe de casa, mas que sempre estava a sorrir, e pela amizade.

Aos amigos do LABOVIR, pelo apoio e dedicação, Jean Berg, Ney Almeida, Ana Cristina, Aracelly Rafaele, Adriana Lopes, Lívia Nogueira, Francisco Esmaelly, Suzana Araújo.

A vovó, Auta Dantas e a vovô Oliveira Dantas, pela torcida, força, apoio, que mesmo de longe, foi valiosa.

A Dalva, Roberta, Michelle, Danúbia, Lidiane, Rebeca e Arlete (*in memoriam*) pela amizade, carinho, força e por terem se tornado parte de minha família.

Aos colegas de Pós-Graduação, especialmente a turma do mestrado, pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos amigos, Alzira, Osmarilda, Helena e Eudmar, pela amizade, força e colaboração.

Ao prof. Albérsio Lima, pela grande colaboração neste trabalho.

A professora Izabel Florindo, pela valiosa ajuda e atenção.

A todos os professores e funcionários do PPGCV, pelos ensinamentos e colaboração.

Ao PPGCV e a UECE pela oportunidade da realização deste curso.

EMBRAPA caprinos e Laboratório de Patologia clínica por ceder suas instalações para realização de parte do experimento, além da hospitabilidade agradável.

Ao laboratório de fitossanidade - UFC e ao Lab. De Bioquímica Humana - UECE pela contribuição, e fornecimento de equipamento que permitiu a execução deste trabalho.

A FUNCAP pelo auxílio financeiro concedido em forma de bolsa.

Aos animais, que são nosso objetivo maior.

Ao frigorífico Marupiara, pela colaboração.

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigada

RESUMO

A Maedi-Visna (MV) pode ser diagnosticada por várias formas, como Imunodifusão em gel de agarose (IDGA), Western blot, Ensaio imunoenzimático (ELISA), Radioimunoensaio,Reação em cadeia de polimerase (PCR), O IDGA é o método recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), porém o ELISA é o método de escolha para grande número de amostras, embora seu custo elevado, tenha dificultado a rotina diagnóstica da MV em ovinos. Por isso, pesquisas são realizadas para conseguir padronizar e comercializar um ELISA brasileiro a fim de facilitar seu uso na rotina diagnóstica. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto para diagnóstico da MV. O antígeno foi obtido a partir de sobrenadante de cultivo celular de membrana sinovial caprina (MSC) inoculado com o Maedi Visna Vírus (MVV) cepa K1514, submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento, e clarificação por centrifugação a 3000 g por 40 min. A suspensão clarificada foi precipitada por polietilenoglicol 8000 (PEG), em seguida foi centrifugada a 12000 g por 60 min, o pellet foi ressuspendido em Tampão Tris-HCl (TNE) e ultracentrifugado a 42000 g por 105 min em colchão de sacarose. O pellet foi ressuspendido em PBS contendo phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). O ELISA foi realizado em microplacas de 96 poços, com incubação de uma hora a 37 ºC e lavagens em cada etapa, o revelador foi o-phenylenediamine (OPD) por 15 min ao abrigo da luz. Para a comparação entre os testes de ELISA e IDGA foram utilizadas 175 amostras de soros. A concentração ótima do antígeno foi 2 μg/mL e a melhor diluição do soro foi 1:100. O ELISA detectou um maior número de positivos (41) que o IDGA (11), apresentando uma sensibilidade de 91%, especificidade de 82%. O ELISA apresentou uma sensibilidade melhor que o IDGA, porém a especificidade ficou abaixo do esperado, o que não inviabilizou seu uso como teste de diagnóstico do MVV.

Palavras chaves: ELISA, diagnóstico, lentivírus

ABSTRACT

The maedi-visna (MV) can be diagnosed by several forms, including immunodifusion in gel of agar (IDGA), Western Blotting, immunoenzimatic assay (ELISA), radioimunoassay, PCR. The IDGA is the method recommended by the Office International des Epizooties (OIE), however ELISA is the method prefered for great number of samples, but its high cost has been hindering it as the routine diagnostic technique for MV in sheep. Therefore researches are accomplished to standardize and to develop a brazilian ELISA tecnhique to facilite your use in the routine diagnostic. The objective of our research was to develop and standardize an indirect ELISA for diagnosis of MV. The antigen was the Virus Maedi- Visna (MVV) obtained from the supernatant of cellulr cultivation of sinovial goat membrane (SGM) inoculated strain K1514, that submited to three cycles of freezing and thawing, soon after it was clarified by centrifugation at 3000 g for 40 min. The clarified suspension was precipitated by PEG 8000 and centrifugation at 12000 g for 60 min. The pellet was resuspended in tris-HCl buffer (TNE) and layered onto a sucrose cushion by centrifugation at 42000 g for 105 min. The pellet was resuspended in PBS containing phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF).The ELISA was perform in plates of 96 wells, by incubation for 1 h at 37 ºC, and washes between steps. The discloser used was the o-phenylenediamine (OPD) for 15 min to the shelter of the light. The tests were compared using the results from 175 serum samples. The great concentration of the antigen was 2 μg/mL and the best dilution of the serum was 1:100. The ELISA detected a larger number of positive (23,4%) than IDGA (6,3%), presenting a better sensibilty than IDGA however the specificity was below than the expected, what didn´t make unfeasible its use a test for diagnosis of MVV.

Key Words: ELISA, diagnosis, lentivirus

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS....12
LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS....15
INTRODUÇÃO....16
REVISÃO DE LITERATURA....18
1. Histórico....18
2. Agente etiológico e sua estrutura....18
3. Infectividade e Replicação viral....20
4. Heterogeneidade Genética....22
5. Antigenicidade....23
6. Resposta Imune....23
7. Patogenia....25
8. Manifestações Clínicas e Características Anátomo – Histopatólogicas....26
9. Epidemiologia....28
10. Transmissão....28
10.1. Transmissão Vertical....28
10.1.1. Infecção Intrauterina / Transplacentária....28
10.1.2. Ingestão de Colostro e Leite....29
10.2. Transmissão Horizontal....29
10.2.1. Importação de Animais....29
10.2.2. Contato Direito entre Animais....30
10.2.2.1. Rota Respiratório....30
10.2.2.2. Transmissão Sexual....30
10.2.3. Contato Indireto....31
10.2.3.1. Transferência de Embrião....31
11. Diagnóstico....31
11.1. Diagnóstico Clínico....31
11.2. Diagnóstico Laboratorial....31
11.2.1. Isolamento Viral....32
11.2.2. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)....32
11.2.3. Hibridização *in situ* (HIS)....33
11.2.4. Microscopia Eletrônica....33
11.2.5. Histopatologia e Imunohistoquímico....33
11.2.6. Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)....34
11.2.7. Reação de imunofluorescência Indireta (IFA)....35
11.2.8. Ensaios Imunoenzimáticos....35
11.2.8.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)....35
11.2.8.2. ELISA duplo sanduíche....36
11.2.8.3.ELISA sanduíche indireto de duplo anticorpo....36
11.2.8.4. ELISA direto....37
11.2.8.5. ELISA Indireto....37
11.2.9. Dot-Blot....37
11.2.10. Western blotting ou Imunoblotting....38
11.3. Fixação de Complemento....38
12. Controle e Profilaxia....38
JUSTIFICATIVA....40

HIPOTÉSE CIENTÍFICA 41
OBJETIVOS 42
GERAL 42
ESPECÍFICO 42
MATERIAL E MÉTODOS 43
1. Cultivo de células 43
2. Titulação do Vírus 43
3. Vírus e Suspensão Viral 43
4. Purificação do vírus e produção do antígeno 44
5. Técnica do ELISA indireto 44
5.1. Otimização das concentrações dos reagentes 44
5.2. Controle de qualidade e repetibilidade do teste 44
6. IDGA 45
7. Soro 45
8. Custo de produção do teste de ELISA 46
9. Analise Estatística 46
RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
CONCLUSÕES 52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53
ANEXOS 64
Anexo 1. Custo de produção do teste de ELISA 65
Anexo 2. Artigo cientifico 67

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Sigla	Nome
X^2	Qui-Quadrado
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Ag	Antígeno
AIEV	Vírus da Anemia Infecciosa Eqüina
BIV	Vírus da Imunodeficiência Bovina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CE	Ceará
CN	Controle Negativo
DFS	Dose Formadora de Sincício
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária
env	gene que codifica as proteínas do envelope viral
FC	Fixação de complemento
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
g	Unidade da força centrífuga relativa
gag	Gene viral que codifica as proteínas interna do vírus
gp	Glicoproteína
H_2O_2	Água oxigenada
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HIS	Hibridização *in situ*
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IDGA	Imunodifusão em gel de Ágar
IFN	Interferon
IL	Interleucina

Sigla **Nome**

KDa	Kilodaltons
L	Litro
LPD	Leite em Pó Desnatado
LTR	Seqüências longas repetidas
LVC	lentivírus caprino
LVO	lentivírus ovino
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
M	Molar
ME	Microscópio eletrônico
MEM	Meio Essencial Mínimo
MG	Minas Gerais
MHC	Complexo de Histocompatibilidade principal
MIN	Minuto
MV	Maedi Visna
mA	Mili-Ampére
mM	mili-molar
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Vírus Maedi-Visna
NaCl	Cloreto de Sódio
NC	Nucleocapsídeo
ng	nanograma
nm	nanômetro
ºC	Graus Celsius
OIE	Organização Internacional de Epizootias
OPD	O-phenylenidiamine
ORF	Pequena região do genoma viral
PBS	Solução de tampão de fosfato
PBS-T	PBS-Tween-20
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de Hidrogênio
PM	Peso Molecular
PMSF	Phenylmethysselphonyl fluroide

Sigla	Nome
pol	Gene que codifica as enzimas virais
PP	Percentual de positividade
Pr	Precursor
rev	Gene de regulação viral
RIA	Radioimunoensaio
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
RJ	Rio de Janeiro
RMF	Região Metropolitana de Fortaleza
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RNAt	RNA transportador
rpm	Rotação por minuto
RU3	Região única não traduzida na extremidade 3’
RU5	Região única não traduzida na extremidade 5’
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SV	Glicoproteína de superfície
tal	Gene de regulação viral
TCID	Dose infecciosa de cultura de tecido
TM	Glicoproteína transmembrânica
TNE	Tampão Tris -HCl
TNF	Fator de necrose tumoral
TR	Transcriptase reversa
UECE	Universidade Estadual do Ceará
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
PPGCV	Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
vif	Gene de regulação viral
LABOVIR	Laboratório de Virologia
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
CPC	Células do plexo coróide

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura. 1. Estrutura do Maedi-Visna Vírus.....19
Figura. 2. Representação esquemática da estrutura do provírus do Maedi-Visna Vírus (MVV). LTR- *long terminal repeat* 20
Figura 3. Ciclo de replicação do Maedi-Visna vírus. Adaptado de Coffin, 1996.....23
Figura 4. Determinação da quantidade de antígeno (2 μg/mL) e diluição do soro empregado no teste de ELISA para o diagnóstico de Maedi-Visna Vírus (MVV).....48

Tabela 1. Determinação do ponto de corte do ELISA para diagnóstico de Maedi-Visna Vírus.....48
Tabela 2. Resultados de 175 amostras de soro ovino pelos testes IDGA e ELISA para o diagnóstico sorológico de MVV.....48
Tabela 3. Comparação dos resultados dos soros ovinos testados pelo IDGA e pelo ELISA para o MVV.....49

INTRODUÇÃO

O rebanho ovino nacional detém aproximadamente 15,18 milhões de cabeças, sendo que 54% deste se encontram no Nordeste (Comini, Nov.2004). A ovinocultura brasileira cresce consideravelmente em quase todo o país sendo constituída principalmente de pele, lã e carne. Com a crescente demanda por produtos ovinos, aumenta o número de empresários dispostos a investir nessas atividades. Com a agroindústria instalada e as tecnologias já disponibilizadas pela pesquisa, capazes de atender aos diversos segmentos da cadeia produtiva, a caprino-ovinocultura brasileira irá se destacar no cenário nacional como atividades de grande impacto sócio-econômica (Vasconcelos & Vieira, 2003).

Porém, pouca ênfase é dada ao controle de doenças infecciosas, especialmente a Maedi-Visna (MV). Esta enfermidade tem se disseminado pelo país em grande parte devido ao desconhecimento do grau de comprometimento dos rebanhos e da dificuldade de acesso ao diagnóstico.

De acordo com as resoluções 65\94 e 66\94 do Mercosul, os países membros do bloco devem certificar-se, em caso de exportação e importação de ovinos e caprinos, que o país de origem dos animais seja livre de MV e de Artrite Encefalite Caprina (CAE) há pelo menos três anos. Estas normas sanitárias salientam a importância econômica de controle e erradicação destas enfermidades (Pinheiro, 2001).

A MV é uma importante doença de ovinos, resultante de uma infecção persistente, constituindo uma doença progressiva e lenta. Os animais acometidos desenvolvem uma doença neurológica degenerativa e inflamatória e/ou uma pneumonia progressiva após um longo período de incubação (Fevereiro *et al*., 1999). O primeiro isolamento do vírus responsável pela MV foi de sistema nervoso central de ovinos em 1960 (Sigurdsson *et al*., 1960) e depois classificado como membro da família *Retroviridae*. A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de colostro e leite infectado. O Maedi-Visna Vírus (MVV) infecta principalmente células da linhagem monócito / macrófago (Narayan & Clements, 1989). A replicação

viral e a expressão gênica são reguladas em parte pelos fatores de ativação e maturação de monócitos em macrófagos (Narayan *et al*., 1980).

As perdas econômicas são grandes, decorrentes de falhas reprodutivas, morte, diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais. Por isso, se faz necessário o controle da doença, o qual depende da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para detectar anticorpos contra MVV incluindo imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Cutlip *et al*., 1977), recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), que apesar de boa especificidade pode apresentar resultados falsos negativos (Knowles, 1997), a fixação de complemento e neutralização de vírus (Torfason *et al*., 1992), Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA) (Houwers *et al*., 1982) e imunoblot (Torfason *et al*., 1992).

Em razão do alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade, ELISA tornou-se o método de escolha para um grande número de amostra, porém o uso de antígeno importado tem dificultado a rotina diagnóstica devido o custo elevado do kit.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Histórico

O MV ou pneumonia progressiva ovina foi o primeiro membro de uma nova categoria de doenças denominadas como uma infecção lenta (Sigurdsson, 1954) .

Sigurdsson *et al*. (1960) isolou o MVV primeiramente do Sistema Nervoso Central (SNC) de ovinos. Tornou-se evidente que o vírus foi introduzido pela importação de ovinos Karakul da Alemanha em 1933. A importação teve como meta melhorar a raça nativa da Islândia, mas a raça Karakul também introduziu adenomatose pulmonar, paratuberculose e visna. Anos mais tarde, caracterizaram os vírus Maedi e Visna como uma espécie semelhante sendo agora identificada como MVV (Straub, 2004).

A doença foi observada, mais tarde, em outras regiões do mundo, sendo a síndrome respiratória de maior prevalência. Vários nomes foram dados a esta enfermidade tais como: Zwoergerziekte na Holanda (de Bôer, 1975; Houwers, 1985), Jaagsiekte na África do Sul (Verwoerd *et al.*, 1983) e Doença Pulmonar de Montanha ou Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) nos Estados Unidos (Cutlip *&* Laird, 1976). O vírus da Pneumonia Progressiva Ovina (PPOV) é o nome atribuído aos isolados Norte Americano de lentivírus ovino (Kwang *et al*., 1995).

2. Agente etiológico e sua estrutura

O MVV é um vírus de ovino não oncogênico que pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivírus* (Pasick, 1998). Vários outros vírus de importância veterinária e humana também estão incluídos neste gênero, como os vírus da Anemia Infecciosa Eqüina (AIEV), da artrite encefalite caprina (CAEV), da Doença de Jembrana e das imunodeficiências humana (HIV), bovina (BIV), felina (FIV) e símia (SIV). Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples tipo de hospedeiro, levando a sérios problemas ou à morte, infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, causando infecção persistente e multissistêmica (AIEV, MVV e CAEV), associada a síndromes de imunodeficiência (SIV, HIV e FIV), apresentando

alta taxa de mutação com conseqüente diversidade genotípica, fenotípica e antigênica (Clements & Payne, 1994; Pinheiro, 2001)

Os lentivírus de ovinos e caprinos podem ser divididos pelo menos em dois grupos biologicamente distintos. O vírus protótipo do grupo I é o visna, vírus islandês cepa 1514. O vírus neste grupo replica-se rapidamente, causando lise em culturas primárias de células de membrana sinovial de caprinos (MSC) e de células do plexo coróide de ovinos (CPC). Este sofre variação antigênica e induz a produção de anticorpos neutralizantes pelo hospedeiro. O protótipo do grupo II é o vírus CAEV cepa Cork (Zink & Jonhson, 1994).

O MVV como os demais lentivírus são partículas esféricas, envelopadas com aproximadamente 100 nm de diâmetro com núcleo cônico e denso (Figura 1), no qual estão inseridas moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg2+ e proteínas do nucleocapsídeo (Gonda *et al*., 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias (TM) e de superfície (SU). Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (Pepin *et al*., 1998).

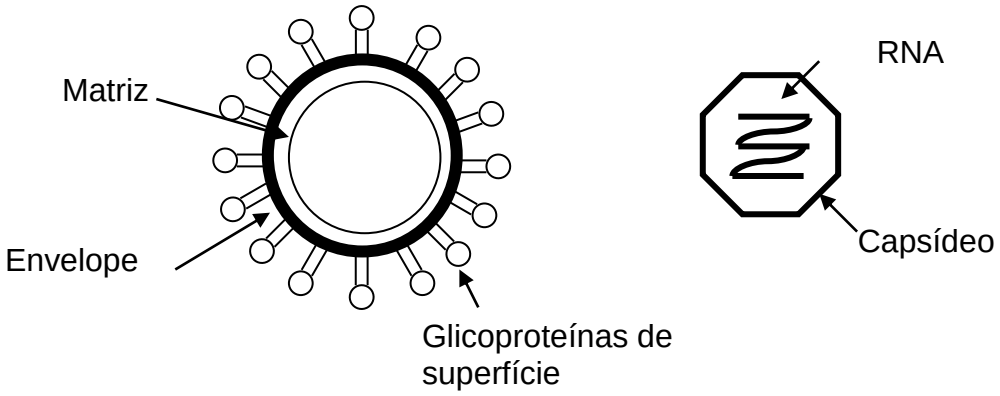

Figura. 1. Estrutura do Maedi-Visna Vírus Adaptado de Madruga *et al*. (2001).

Os genomas dos lentivírus contém pequenos ORFs que codificam proteínas que regulam a expressão gênica (*tat* e *rev*), fazem o controle da produção de partículas virais infecciosas (*vif* e *vpu*) e estão envolvidos na manifestação da doença *in vivo* (*vpr* e *nef*) (Figura 2). Estes genes, únicos, de lentiviroses mostram um pequeno nucleotídeo ou aminoácido homólogo diferenciando as várias lentiviroses, entretanto, suas funções são conservadas (Clements & Payne, 1994).

O genoma das lentiviroses contém genes estruturais (*gag* e *env*) e genes enzimáticos (*pol*) típicos da família Retroviridae. Entretanto, o genoma dos lentivírus codifica a proteína que regula a expressão viral (TAT e REV) assim como proteínas auxiliares que tem funções não completamente elucidadas (VIF, VPR/ VPX, VPV e NEF). Os genes auxiliares não são rigorosamente requeridos para replicação viral em culturas celulares e diferentes sublocais destes genes são encontrados entre as lentiviroses; entretanto, eles estão emergindo como importantes genes no desenvolvimento *in vivo* da doença. A proteína VIF está presente no vírus e facilita a infectividade e disseminação de vírus particularmente para linfócitos e macrófagos (Clements & Payne, 1994; Querat *et al*., 1990; Hamache *et al*., 1998 e 1995; Clements & Zink, 1996).

A proteína VIF (fator de infectividade viral) está presente no vírus aparentemente para facilitar a infectividade e difusão do mesmo particularmente, em linfócitos primários e macrófagos (Clements & Payne, 1994).

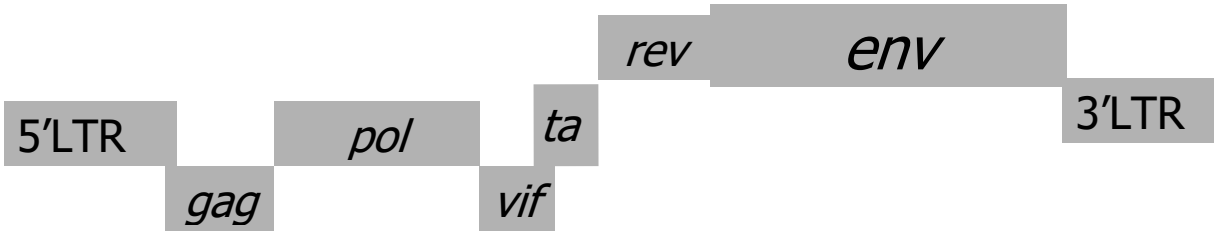

Figura. 2. Representação esquemática da estrutura do provírus do Maedi-Visna Vírus (MVV). LTR- *long terminal repeat*

3. Infectividade e Replicação viral

Os lentivírus são altamente espécie-específicos, usualmente replicam-se somente em células que se originam de seu hospedeiro natural. Os lentivírus têm sido isolados de vários animais incluindo primatas não humanos e humanos (Clements & Payne, 1994).

O MVV infecta ovinos e caprinos tanto natural como experimentalmente (Banks *et al*., 1983; Leroux *et al*., 1995;Castro *et al*., 1999). Infecta, *in vivo*, células das linhagens de monócitos e macrófagos (Narayan & Clements, 1989). *In vitro,* os Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) replicam-se em cultivos de células fetais do plexo coróide (Sigurdsson *et al*., 1960), músculo liso cardíaco (Leroux *et al*., 1995), baço, timo, linfonodo escapular (Narayan *et al*., 1980), membrana sinovial

caprina (Crawford *et al*., 1980), células de linhagens fibroblásticas imortalizadas (Teixeira *et al*., 1997) e tecido epitelial (Lee *et al*., 1996). O efeito citopático produzido consiste na formação de células gigantes multinucleadas (sincício) e lise celular (Carey & Dalziel, 1983).

Segundo Gendelman *et al.* (1986), a infecção nas células depende da presença de receptores para o vírus. Verificaram, também, que poucos monócitos têm estes receptores, entretanto aumentam após sua maturação. Os linfócitos têm sido também infectados, porém sem multiplicação viral (Zink & Johnson, 1994). Os testes imunohistoquímico e de hibridização *in situ* têm demonstrado que os LVPR podem penetrar naquelas células, entretanto a infecção produtiva é restrita às células de linhagem dos macrófagos (de la Concha – Bermejillo, 1997) e da glândula mamária (Lerondelle *et al*., 1999; Mselli – Lakhal *et al*., 1999).

Os receptores para entrada de lentivírus de pequenos ruminantes dentro das células ainda não estão bem caracterizados. A capacidade dos LVPR para replicar em uma ampla cadeia de células sugere que ambos os vírus utilizem uma molécula comum como receptor ou use um número de diferentes receptores para entrar nas células. Dois estudos sugerem que a molécula MHC classe II tem sido o receptor para MVV (Zink & Johnson, 1994).

Macrófagos infectados com MVV recrutam linfócitos agindo como apresentador de antígeno às células e posteriormente aos linfócitos T citotóxicos CD8+ (Lee *et al*., 1994).

Sítios primários de infecção incluem o cérebro, nódulo linfático, baço e medula óssea. A replicação viral nestes sítios serve como reservatório para o vírus infectar células precursoras (em medula óssea), assim como a localização primária de produção do vírus, presença de antígeno e a inibição da resposta imune para infecção viral. Apesar de um longo período para o desenvolvimento da doença, a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro ocorrem nas primeiras semanas após a infecção do vírus (Narayan & Clements, 1989). A disseminação do vírus para os múltiplos órgãos envolvidos na doença ocorrerá pelos monócitos infectados que não expressam o vírus (Clements & Payne, 1994).

A replicação viral geralmente é limitada por determinados fatores, entre os quais se cita a restrição viral mediada por interferon, produzido por linfócitos ativados durante sua interação com os macrófagos infectados. O interferon inibe a maturação de monócitos, e conseqüentemente a maturação viral (Zink *et al*., 1987).

Os lentivírus de pequenos ruminantes penetram na célula por fusão da membrana plasmática celular rompendo-a parcialmente. O RNA viral é copiado pela transcriptase reversa, gerando um DNA de fita dupla que poderá integrar-se ao genoma celular pela ação das integrases e LTRs virais (Haase *et al*., 1974). Após a integração de genoma, a célula pode produzir o vírus ou permanecer persistentemente infectada com baixa ou nenhuma expressão viral. No caso de expressão ativa do vírus, ocorre a transcrição com produção de RNAm que será codificado no citoplasma para a produção de proteínas reguladoras. O estágio final do ciclo envolve a reunião dos produtos dos genes estruturais, incorporação do RNA genômico às partículas virais e aquisição do envelope viral, que em macrófagos é obtido pelo brotamento de vesículas citoplasmática, rompidas com o excesso de partículas virais (figura 3). Nos fibroblastos, o envelope é obtido pelo brotamento da membrana plasmática (Fields *et al*., 1996)..

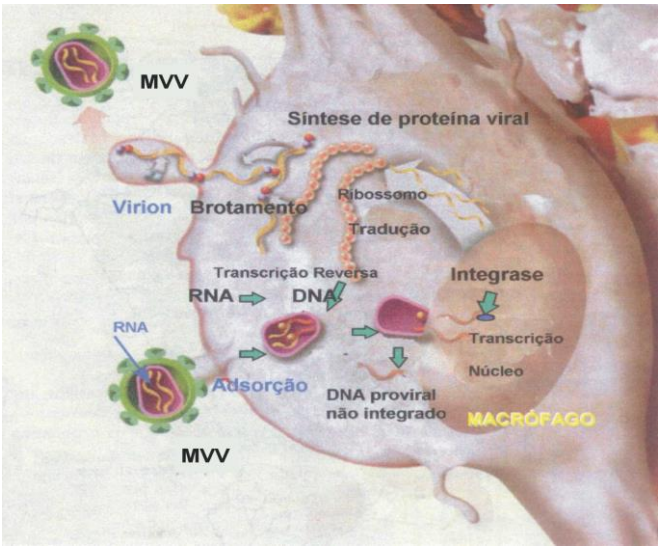

Figura 3. Ciclo de replicação do Maedi-Visna vírus. Adaptado de Coffin, 1996.

4. Heterogeneidade Genética

A tradicional visão que a Maedi – Visna e a Artrite – Encefalite caprina são causadas por agentes etiológicos distintos podem estar antiquadas à luz das novas discussões. Em substituição, os LVPR são mais bem vistos dentro do conceito de *quasispecies* virais (Pasick, 1998).

Os lentivírus têm alta taxa de mutação, de 0,5 a 1 genoma por ciclo de replicação, que são acumulados e auxiliam a rápida evolução desse grupo de vírus

(Castro, 1998). Coffin (1996) e Preston & Doughenty (1996) relataram que estas mutações decorrem, geralmente, de erros nas polimerizações durante o ciclo de replicação lentiviral, com substituições de bases, arranjo genético, recombinação e hipermutações. A principal responsável por erros é a TR que, ao contrário das polimerases celulares, apresenta baixa fidelidade, devido à ausência da ação 3' – 5' exonuclease necessárias às correções de erros surgidos durante a polimerase celular, durante a replicação do DNA proviral, e da RNA polimerase celular II, quando da síntese de RNA a partir do DNA proviral (Preston & Dougherty, 1996).

5. Antigenicidade

Narayan *et al*. (1980) verificaram a relação antigênica entre a proteína p30 do MVV e um vírus responsável por leucoencefalomielite caprina. A respeito da reação cruzada, demonstrou que o vírus caprino era também antigeneticamente distinto, uma vez que não foi neutralizado por uma amostra de soro ovino com altos títulos de anticorpos neutralizantes para o MVV. Os lentivírus CAEV e MVV manifestaram-se intimamente relacionados imunologicamente, pois um soro caprino infectado com CAEV precipitou proteínas e glicoproteínas dos dois vírus, apesar do perfil eletroforético dos vírus diferir significativamente, com exceção da proteína do capsídeo que apresentou peso molecular de 28 Kda para a CAEV e 27 KDa para o MVV (Dahlberg *et al*., 1981).

6. Resposta Imune

O vírus persiste no animal apesar de uma resposta imune humoral e celular, com a maioria dos animais infectados permanecendo assintomáticos por anos. Portanto, a identificação dos portadores de vírus no rebanho pode ser baseada na detecção de anticorpos específicos para MVV. A resposta humoral contra as proteínas virais produzidas pelos genes *gag* e *env* aparecem inicialmente após infecção natural e experimental, e varia muito com a duração do curso da doença. Tem-se mostrado que os anticorpos direcionados contra p25, p16 e p14 desaparecerem em estágios tardios da doença (Fevereiro *et al*., 1999).

Anticorpos humorais são usualmente detectados entre dois a três meses da inoculação de amplas doses de vírus maedi e este pode ser recuperado de leucócitos sanguíneos apesar do aparecimento de anticorpos neutralizantes (Sihvonen, 1981).

Tizard (1998) afirma que a resposta imune contra os vírus pode ser observada de duas formas principais, contra as próprias proteínas do vírus, principalmente as do capsídeo e do envelope, como no caso do MVV, ou impedindo a infecção da célula alvo pelo vírus. Esse impedimento da infecção celular pode ocorrer através do bloqueio da adsorção de um vírus recobrindo a célula alvo, iniciando a virólise mediada pelo complemento, causando agrupamento dos vírus, reduzindo assim o número de unidades infectantes disponíveis, ou pelo estímulo da fagocitose dos vírus pelos macrófagos.

Inicialmente a resposta imune mediada por célula para MVV tem sido demonstrada em ovino entre duas a nove semanas (Sihvonen, 1981) e uma a seis semanas após inoculação experimental com o Maedi e o visna vírus, respectivamente (Sihvonen, 1984). Um propósito da resposta imune celular mediada é lisar as células que expressam antígenos estranhos na sua superfície, neste caso macrófagos. Pouco se sabe da capacidade dos macrófagos infectados com CAEV ou MVV de agirem como apresentadores de antígeno, mas a proporção de macrófagos infectados nos tecidos é usualmente baixa, sugerindo que a lise imuno mediada de macrófagos infectados não suprime diretamente a resposta imune (Zink & Johnson, 1994).

A primeira resposta humoral no MVV é detectada em torno da terceira semana e está principalmente dirigida contra a proteína do capsídeo; por volta da quinta semana são produzidos anticorpos contra as demais proteínas (do nucleocapsídeo, matriz transmembranária e de superfície) (de la Concha – Bermejillo *et al*., 1995).

Os anticorpos neutralizantes são produzidos em quantidades limitadas, tardiamente e são de baixa afinidade, de modo que não impedem o ciclo de replicação viral (Kennedy – Stoskopf & Narayan, 1986; Bertoni *et al*., 1994).

A habilidade para replicar em macrófagos e a dependência de replicação viral na maturação celular são os fatores chaves na patogênese de doenças causadas pelos lentivírus de ovinos e caprinos. Macrófagos são células de vida – longas que derivam de promonócitos na medula óssea, circulando como monócitos no sangue e são distribuídos para todo tecido no corpo que são maturados e diferenciados em macrófagos teciduais. Promonócitos infectados latentemente podem ser detectados na medula óssea de animais infectados

experimentalmente logo após inoculação e durante todo o curso da doença (Zink & Johnson, 1994).

Devido à replicação viral ser maturação dependente, estas células imaturas da linhagem macrófago podem permanecer persistentemente infectadas por longos períodos de tempo. Na ausência de expressão de antígeno viral, o hospedeiro é incapaz de detectar o vírus. A medula óssea então age como um reservatório de vírus, continuamente libera monócitos infectados persistentemente para o sangue periférico, os quais são então distribuídos por todo o corpo. Quando as células maturam no tecido, a expressão gênica viral é regulada e o sistema imune do hospedeiro é então exibido para o antígeno viral (Zink & Johnson, 1994).

Jan *et al*. (2000) verificaram *in vitro,* que as células endoteliais vasculares infectadas apresentam capacidade de ligação aos leucócitos duas vezes maiores que as células não infectadas e que as mesmas mantiveram a expressão de marcadores, aumentaram inicialmente a expressão de antígeno MHC- I e posteriormente MHC – II. Tais eventos podem contribuir para a distribuição de células linfóides nos tecidos e para demonstrar uma resposta imune local na infecção dos LVPR.

7. Patogenia

Em contraste com as lentiviroses que causam imunodeficiência, a mudança patológica induzida pelas lentiviroses de pequenos ruminantes é caracterizada pela intensa infiltração e proliferação de linfócitos e macrófagos. Cultivo celular e estudos *in vivo* têm demonstrado a interação de macrófagos primários de ovinos ou caprinos infectados com um único tipo de interferência, LV – IFN. Esta citosina tem sido detectada *in vivo* no pulmão e articulações de animais infectados. O LV – IFN induz a expressão de antígenos MHC classe II nos macrófagos. Este aumento pode apresentar antígenos virais para células T – helper, as quais secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, algumas com atividade quimiotática para monócitos e linfócitos. Estas citocinas podem então contribuir para uma intensa inflamação vista nos tecidos afetados (Zink & Johnson, 1994).

De la Concha Bermejillo (1997) relata que a base do desenvolvimento das lesões dos LVPR parece ser a infecção dos macrófagos. Em resposta ao vírus,

a formação de imunocomplexos e a replicação lítica nos macrófagos podem ser responsabilizadas pelas lesões desencadeadas.

Os macrófagos e outras células persistentemente infectadas podem produzir e liberar citosinas e proteínas virais com efeito citolítico sobre as células vizinhas provocando lesões nos órgãos – alvo (de la Concha – Bermejillo, 1997).

Para caracterizar a resposta inflamatória no cérebro e no pulmão, a coloração imunohistoquímica foi realizada nos tecidos de ovinos com encefalites e pneumonia usando um grupo de anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície de células inflamatórias ovinas (Zink *et al*., 1990).

De acordo com os resultados obtidos por Zink & Jonhson, (1994), a célula inflamatória predominante no cérebro foi o linfócito T CD8+. Em adesão às células T CD8+, houve moderado número de macrófagos e células T CD4+ e somente um pouco de células B e células T $\delta\ \gamma$ em cérebro encefálico. Os resultados mostram, também, que houve uma expressão abundante de antígeno MHC classe II com evidente inflamação e em seções normais mais adjacentes do cérebro. O perfil de células inflamatórias no pulmão foi um pouco diferente do que ocorre no SNC. Apesar do moderado número de células T CD8+ e macrófagos estarem presentes difusamente nos pulmões de animais com pneumonia, as células inflamatórias mais comuns eram linfócitos B. Estas células estavam presentes no septo interalveolar, no interstício perivascular e inclusão da maioria das células nos folículos linfóides, os quais constituem características de pneumonia progressiva ovina. Era intensa a expressão de antígenos MHC classe II por todo pulmão. Este estudo imunohistoquímico demonstrou a importância das células T CDB+ na resposta inflamatória para lentivírus e confirmou que todas as células necessárias para produção de interferon induzido pelo lentivírus estão presentes no cérebro e pulmão afetados (Zink & Jonhson, 1994).

8. Manifestações Clínicas e Características Anátomo – Histopatólogicas

O lentivírus ovino causa doença multissistêmica, com lesões caracterizadas da infiltração de células mononucleares e linfoproliferação (Brodie *et al*., 1998).

Os ovinos geralmente exibem sinais da doença no segundo ano de infecção e morrem após uma prostração e doença progressiva (Haase, 1986). Intolerância ao exercício, fadiga ou deficiência para caminhar com o rebanho são

frequentemente observados. Mastite fibrótica e artrite não supurativa são reconhecidas como componentes do complexo de doença induzido pelo lentivírus ovino (Brodie *et al*., 1998).

Às vezes, vasculite afeta as pequenas artérias e arteríolas dos rins e pode estar associada com lesões de pulmão, articulação e sistema nervoso central (Cutlip *et al*., 1998).

A forma pulmonar de MV em ovinos é mais comumente presente como pneumonia intersticial crônica com sinais de doença respiratória progressiva. Como a severidade da doença pulmonar progride, os ovinos afetados demonstram respiração pela boca, tosse, corrimento nasal, aumento da taxa respiratória e expiração forçada. Ovinos infectados com lentivírus, sem infecções oportunistas, são usualmente não febris ou anoréxicos (Brodie *et al*., 1998).

À necropsia, os pulmões de ovinos com infecção crônica de lentivírus pesam freqüentemente, duas a três vezes o peso normal. Quando removidos do animal, os pulmões não colapsam e frequentemente demonstram pequenos (1 a 2 mm) focos cinzentos na superfície pleural, difusamente espalhados. Microscopicamente, estas lesões são caracterizadas pela infiltração e acúmulo de linfócitos e macrófagos dentro do septo alveolar (Brodie *et al*., 1998).

Alguns animais podem apresentar mastite indurativa linfocítica, resultante de um aumento, simétrico e firme da glândula mamária, que difere clinicamente da mastite causada por infecção bacteriana. A doença resulta em redução da produção de leite, que é causada possivelmente pelo bloqueio dos ductos da teta pelo acúmulo de linfócitos e fibrose circunferencial (Oliver *et al.,* 1981, Cutlip *et al.,* 1998).

A infecção pode resultar em laminite e aumento doloroso de uma ou mais articulações, especialmente a do carpo e tarso. O Lentivírus foi isolado de articulações em um grupo de ovinos naturalmente infectados. Num exame geral, articulações artríticas são frequentemente edematosas e exibem necrose e mineralização sinovial. Hiperplasia sinovial com edema, hiperemia, linfocite subsinovial e infiltração celular são achados histológicos comuns (Brodie *et al*., 1998).

Meningoencefalomielite é caracterizada por tremor, ataxia e ocasionalmente por paralisia progressiva do membro posterior. Num exame geral, o cérebro e medula espinhal usualmente aparecem normais. Histologicamente,

infiltração inflamatória linfoplasmacítica das leptomeninges, frequentemente envolve ambos o cérebro e medula espinhal, e formação nodular linfocítica no plexo coróide, são observados no início e como características patológicas subclínicas da doença (Constable *et al.,* 1996).

9. Epidemiologia

Com relação à ocorrência de MV no Brasil, esta teve seu diagnóstico sorológico por anticorpos contra o vírus comprovado em vários estados como: Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Paraná (Moojen, 1986), Pernambuco (Abreu, 1998).

No Brasil, Moojen *et al*. (1995) obteve o MVV por isolamento em células infectadas de ovinos soropositivos. As células infectadas foram submetidas à microscopia eletrônica e desta forma, concluído o primeiro isolamento deste vírus no país.

No Ceará, foram realizados os primeiros levantamentos soro epidemiológicos através de técnica de IDGA, em animais destinados a abate na região metropolitana de Fortaleza, onde se observou um percentual de 31,61% dos animais avaliados eram positivos (Almeida & Teixeira, 1999).

10. Transmissão

Os lentivírus de ovinos e caprinos são transmitidos tanto horizontalmente quanto verticalmente. A transmissão horizontal ocorre pela inalação de exsudatos respiratórios contendo vírus ou células infectadas. A transmissão vertical provavelmente ocorre pela ingestão de leite e colostro contendo macrófagos infectados (Zink & Johnson, 1994).

O vírus é transmitido através do colostro, leite e exsudatos respiratórios oriundos de animais infectados (Blacklaws *et al*., 2004). A principal forma de infecção de rebanhos livres se dá por meio da introdução de animais portadores oriundos de rebanhos contaminados.

10.1. Transmissão Vertical

10.1.1. Infecção Intrauterina / Transplacentária

O fato da infecção intra-uterina ocorrer tem sido discutido em vários estudos sendo a rota mais controversa de transmissão. Lamara *et al.* (2001, 2002)

mostraram que células epiteliais do oviduto caprino podem ser infectadas *in vitro* com CAEV, apesar de não haver relatos se as células são naturalmente infectadas *in vivo.* Em adição, os LVPR têm sido demonstrados pela análise de PCR em oviduto, fluido uterino de cabras infectados com CAEV e em amostras de tecidos de útero e oviduto (Fiene *et al*., 2002, 2003, Pinheiro, A.A., 2001), sugerindo que fetos podem ser expostos ao vírus *in vivo.*

10.1.2. Ingestão de Colostro e Leite

A glândula mamária é um órgão alvo bem reconhecido para a doença induzida por LVPR com lesões patológicas e vírus (Blacklaws *et al*., 2004).

O vírus tem sido demonstrado em colostro ou leite de animais infectados com MVV. Leroux *et al*. (1997) demonstraram LVPR em leite de ovinos naturalmente infectados. Carrozza *et al*. (2003) evidenciaram que as células hospedeiras do vírus em secreções mamárias são macrófagos. Entretanto, células epiteliais em colostro e leite pode ser também uma fonte de infecção, como são permissivas para replicação do vírus *in vitro* e células epiteliais derivadas de leite de uma cabra naturalmente infectada produziram vírus em cultura (Mselli – Lakhal *et al*., 1999).

10.2. Transmissão Horizontal

10.2.1. Importação de Animais

A troca de animais vivos através das fronteiras nacionais é considerada uma importante causa de transmissão horizontal de LVPR. O MVV foi introduzido na Islândia pela importação de 20 ovinos KaraKul da Alemanha (Blacklaws *et al.,* 2004).

Segundo Blacklaws *et al*. (2004), os ovinos importados não foram testados para MVV, mas perda por Maedi nunca existiram no rebanho em Halle dos quais os ovinos vieram, entretanto estes animais foram sugeridos ser fonte desta nova doença infecciosa na Islândia (Blacklaws *et al*., 2004).

Entre 1955 e 1965, em torno de 2500 ovinos Texel foram importados da Dinamarca para a Holanda. O MVV foi primeiramente diagnosticado na Dinamarca e muito dos rebanhos que tinham ovinos Texel ou seus descendentes eram diagnosticados com MVV. Foi, portanto, sugerido que o MVV era importado com os ovinos Texel (Blacklaws *et al*., 2004).

No Brasil, a partir dos anos 70, as importações de ovinos e caprinos de raças exóticas, procedentes de diversos países da Europa e América do Norte buscavam a introdução de material genético em animais puros ou de seus cruzamentos com mestiços de raças nativas vieram os casos de maedi-visna (Assis, 1994).

10.2.2. Contato Direito entre Animais

10.2.2.1. Rota Respiratório

Estudos iniciais na Islândia demonstraram que o contato direto ou fechado entre animais constitui um outro fator importante na transmissão do vírus, além da ingestão de colostro e leite. Foi demonstrado que o confinamento de ovinos no mesmo lugar durante o inverno resultou no aumento da taxa de infecção (Blacklaws *et al*., 2004).

Outros estudos têm também demonstrado a vantagem da segregação de animais na redução da taxa de infecção. Os fatores de risco associados com o aumento da taxa de transmissão de vírus inclui aumento da idade, alta densidade e aumento da duração de exposição (Blacklaws *et al*, 2004).

Recentes comparações têm mostrado que a infecção via traqueal é muito mais eficiente que administração intranasal (Torsteinsdottir *et al*., 2003). A dose infecciosa mínima nesse estudo foi de 10 $TCID_{50}$ via traqueal, enquanto que para a rota intranasal foi de 10^7 $TCID_{50}$.

Entretanto, o vírus foi isolado de swabs traqueais ou saliva de ovinos infectados, sugerindo que secreções do trato respiratório superior não é a principal fonte de infecção. Uma possível alternativa de fonte infecciosa de vírus no campo é o fluido pulmonar expelido pela tosse (Blacklaws *et al*., 2004).

10.2.2.3. Transmissão Sexual

Lesões patológicas foram observadas nos testículos de 517 carneiros infectados com MVV, sugerindo que o vírus pode ser transmitido via sêmen. Blacklaws *et al*. (2004), sugerem que a presença do vírus no sêmen pode ser devido à excreção de células epiteliais epididimais. Os resultados destes estudos mostraram que a infecção corrente ou inflamação nos testículos induz a liberação do MVV dentro do sêmen. Entretanto, o uso de carneiros infectados com o MVV para

procriação com ovelhas não infectadas, e alojadas separadamente, não causou soroconversão das mesmas (Blacklaws *et al*., 2004).

10.2.3. Contato Indireto

10.2.3.1. Transferência de Embrião

Não há evidência que a transferência de embrião constitui uma rota de transmissão do vírus, embora estudos definitivos não tenham sido confirmatórios. A Organização Internacional para Transferência de Germoplasma aceita que embriões não apresentam risco significativo pra transmissão do vírus, desde que eles sejam levados de acordo com os protocolos da Sociedade Internacional de Transferência do Embrião (IETS) e sejam provenientes de rebanhos soronegativos (Blacklaws *et al*., 2004).

11. Diagnóstico

11.1. Diagnóstico Clínico

Observam-se as manifestações da sintomatologia como pneumonia, artrite, mamite ou encefalite, dados epidemiológicos e manejo dos animais. Porém, o diagnóstico de MV só é confirmado com testes laboratoriais (Pinheiro, 2001).

11.2. Diagnóstico Laboratorial

Muitos fatores dirigem o diagnóstico sorológico de ovinos infectados com MVV, incluindo uma variação no tempo relativo ao início da infecção, especificidade da proteína viral de anticorpos do soro e sua quantidade, efeitos da cepa viral e diferenças baseadas nos hospedeiros com relação à resposta imunológica para infecção (DeMartini *et al*., 1999).

As características da relação hospedeiro-lentivírus que afetam a detecção em ovinos infectados incluem heterogeneidade viral e mutação em animais infectados e baixos níveis de replicação viral *in vivo.* Os ovinos infectados podem ser detectados com base na presença de anticorpos antivirais no soro, detecção de proteínas ou ácido nucléico, ou pelo isolamento do vírus (DeMartini *et al*., 1999).

Esta enfermidade pode ser diagnosticada por vários métodos, entre eles: isolamento do vírus por cultivo celular, microscopia eletrônica, reação em cadeia de polimerase, imunodifusão em gel, de agarose, imunofluorescência indireta e ELISA .

Segundo Riet-Correa, (2001) os materiais a serem coletados para o diagnóstico laboratorial são: Soro; sangue total, leite e sêmen, em caso de necropsia, articulações, pulmão, encéfalo, e glândula mamária podem ser, também, enviados ao laboratório para isolamento viral, devendo ser feito o mais rápido possível e sob refrigeração. Partes do tecido pulmonar, glândula mamária, encéfalo, medula espinhal e articulações para histopatologia acondicionados em frasco de boca larga contendo formol.

11.2.1. Isolamento Viral

Apesar do diagnóstico determinante do vírus da infecção ativa pelo MVV ser alcançado quando do isolamento deste agente em cultivo celular, esta técnica é demorada, dispendiosa, e requer a implantação e manutenção de cultivos celulares especiais (Knowles, 1997). Geralmente os LVPR podem ser isolados de animais vivos pelo cocultivo de células como leucócitos do sangue periférico, células somáticas de leite, com células de plexo coróide ovino para MVV ou células de membrana sinovial caprina para o CAEV (Pinheiro, 2001).

O MVV foi isolado na França em 1980 por Russo e colaboradores, a partir do cocultivo de células de plexo coróide e leucócitos de um ovino clinicamente doente. O efeito citopático (ECP) foi observado na terceira passagem e consistia de sincícios contendo de cinco a seis núcleos dispostos em forma de roseta. As tentativas de isolamento viral a partir do cocultivo de pulmões e gânglios traqueobrônquicos com células de plexo coróide e pulmão de feto ovino foram frustadas, mesmo após três passagens (Reischak, 2000).

Um lentivírus ovino foi isolado de células mononucleares do sangue dos ovinos natural e experimentalmente infectados (de la Concha – Bermejillo *et al*., 1997). Tanto o MVV como o CAEV replicam produtivamente em macrófagos e cultivos celulares de MSC, no entanto, um padrão restritivo de replicação do CAEV foi observado por Chebloune *et al*. (1996) em cultivo celular de plexo coróide de ovino.

11.2.2. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase tem sido utilizada em alguns laboratórios de forma mais restrita, pois é ainda um teste caro, porém possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicado para animais de alto valor zootécnico

e para aqueles que o resultado de outros testes não tenham sido conclusivos (Riet-Correa, 2001).

Vários trabalhos têm demonstrado com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR. A PCR permite a identificação por amplificação direta de parte do ácido nucléico viral específica de fluidos e tecidos de um animal infectado (Pinheiro, 2001).

A detecção de infecção por LVPR através de PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da seqüência alvo e da especificidade do *primer.* Entretanto, esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que a PCR seja empregada para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos (Knowles, 1997).

11.2.3. Hibridização *in situ* (HIS)

Segmentos específicos de ácido nucléico de origem viral encontrados em tecidos ou células infectados são capazes de ser detectados por sondas marcadas por enzimas ou radiotivamente através da HIS (Brown, 1998).

Zink *et al*. (1990) detectaram através da HIS, quais as células e tecidos de caprinos naturalmente infectados pelo CAEV apresentaram replicação viral, e observaram células com transcritos virais nos pulmões, cérebro, glândula mamária, articulações e medula espinhal.

11.2.4. Microscopia Eletrônica

Cutlip & Laird (1976) estudando *in vitro*, células embrionárias de pulmão ovino infectado com o MVV observaram, por microscópio eletrônico, vários brotamentos virais com 120 a 140 nm de diâmetro, além de virions livres no espaço extracelular, e, virions e fragmentos virais no citoplasma de células infectadas.

Moojen (1996), no Brasil, observou partículas virais maduras na superfície e brotamentos intracitoplasmáticos em cortes ultrafinos de cultivo celular do MSC infectadas com amostras de CAEV de origem francesa e, de diferentes estados brasileiros.

Almeida (2003) detectou MVV pela microscopia eletrônica de transmissão de animal naturalmente infectado.

11.2.5. Histopatologia e Imunohistoquímico

Os exames anátomo histopatológico e imunohistoquímico têm sido utilizados para auxiliar o diagnóstico de infecções por lentivírus de pequenos ruminantes (Pinheiro, 2001).

Georgsson & Pálsson (1971) fizeram um estudo histopatológico em ovinos infectados natural e experimentalmente com MVV e obtiveram como principais achados uma inflamação intersticial crônica com densa infiltração celular, hiperplasia do músculo liso no septo alveolar e hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial. Com o passar do tempo à análise histopatológica passou a ser utilizada como um auxílio ao diagnóstico, uma vez que a mesma não é conclusiva, mesmo quando associada ao conhecimento do quadro clínico e epidemiológico.

O exame histológico de tecidos pulmonares e mamários de ovinos naturalmente infectados revelou a presença de fatores tipicamente associados com o MVV. Os pulmões apresentaram infiltração difusa de células linfóide e macrófagos no interstício pulmonar, com acúmulo peribronquiolar e perivascular local. A glândula mamária mostrou pronunciada hiperplasia linfóide e infiltração de células mononucleares (Carrozza *et al.,* 2003).

11.2.6. Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

Recomendado pela OIE, por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas, o IDGA é a forma de diagnóstico mais utilizada em todo mundo, principalmente em programas de controle da doença que já são empregados em vários países (Moojen, 1995). Além da fácil aplicabilidade o IDGA tem alta especificidade, o que acaba credenciando-o para a realização dos diagnósticos de triagem (Varea *et al*., 2001).

De acordo com Tortora *et al.* (2000), os testes de imunodifusão consistem em reações de precipitação, realizada em gel de ágar em uma placa de Petri ou em uma lâmina de microscópio. Neste desenvolve-se uma linha de precipitação visível entre os orifícios no ponto em que é alcançada a relação ótima entre antígeno e anticorpo.

Segundo Vitu *et al.* (1982), o teste de IDGA é capaz de identificar animais experimentalmente infectados com MVV cerca de quatro a cinco meses após a infecção, e afirma ainda que este teste mostrou-se mais sensível que o teste

de fixação do complemento, sendo que quando comparado com ELISA mostrou resultados bastante correlacionados, apesar de quando o teste utilizado é o ELISA a infecção pode ser identificada de forma mais precoce (sete semanas pós período de Incubação). Este fato foi confirmado por Larsen *et al*. (1982), que avaliando ovinos infectados experimentalmente infectados observaram presença de anticorpos precipitantes, podiam ser detectados de forma mais precoce e com maior intensidade que a fixação do complemento.

O teste IDGA pode ser utilizado para a detecção de anticorpos anti-MVV tanto no soro sanguíneo quanto no colostro de animais infectados, e a presença de anticorpos no colostro pode ser utilizada na detecção da infecção no rebanho (Alkan & Tan, 1998).

11.2.7. Reação de imunofluorescência Indireta (IFA)

As reações de imunofluorescência indireta possibilitam a visualização da interação antígeno/anticorpo, através de uma anti-imunoglobulina marcada com fluorocromos. Estas substâncias são capazes de absorver energia luminosa tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo, e para retornarem ao seu estado normal tais substâncias passam a liberar energia na forma de fluorescência. Os fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina e isotiocianato de fluorescência (Schade, 1995).

São poucos os trabalhos empregando IFA no diagnóstico dos lentivírus de pequenos ruminantes. No Brasil, Reischak (2000) desenvolveu uma IFA utilizando três vírus brasileiros de caprinos e um de ovino e comparou com o teste do IDGA usando antígeno do MVV. Em amostras de soro caprino e ovino, verificou-se que a IFA detectou mais animais soropositivos que o IDGA, sendo que foram observados resultados diferentes de acordo com as cepas virais e os tipos celulares empregados.

11.2.8. Ensaios Imunoenzimáticos

11.2.8.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Devido à técnica do ELISA ter um alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade e permitir automação, tornou-se um método de eleição para exame de um grande número de amostras. Têm-se vários tipos de ELISA, como o direto, indireto, duplo sanduíche direto e o ELISA duplo sanduíche indireto.

Dentre outras vantagens do ELISA, estão à estabilidade e o pequeno volume de reagentes, resultados de natureza quantitativa, possibilita rápida execução diagnóstica, apresenta baixo nível de risco biológico, pode ser também usada para estudos epidemiológicos (Tizard,1998).

Segundo Knowles (1997) diversos teste de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para LVPR, onde são empregados tanto antígenos nativos como recombinantes.

Houwers *et al*. (1982) desenvolveram um ELISA para detecção de anticorpos para o MVV de fixação com um antígeno parcialmente purificado, compararam com a IDGA e o teste de fixação de complemento (FC) e verificaram que todas as amostras positivas no IDGA, FC ou ambas também foram positivas no ELISA. Em adição, o ELISA detectou mais 11,5% de soropositivos.

Na década passada, o uso de proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos em diferentes ELISAs aumentaram o diagnóstico sorológico da infecção. Um ELISA desenvolvido recentemente é baseado na proteína recombinante de MVV do capsídeo (p25) e uma proteína transmembranária sintética (TM) (Extramiana *et al*., 2002).

Fevereiro *et al*. (1999) desenvolveu um ELISA com anticorpos monoclonais (ELISA blocking) e comparando com um ELISA indireto comercial, provou que o ELISA blocking foi especifico, sensível e mostrou alto reprodutividade e baixa variabilidade.

Pinheiro (2001) desenvolveu um ELISA indireto para diagnóstico de CAEV com antígeno completo.

11.2.8.2. ELISA duplo sanduíche

O ELISA duplo sanduíche é utilizado para detectar antígenos. Envolve primeiramente o revestimento de placas de poliestireno com anticorpos de captura. Acrescenta-se então a solução de antígenos, de forma que o antígeno se conjugue com o anticorpo de captura. Isso é seguido, após uma lavagem, pela adição de um anticorpo específico, uma antiglobulina marcada com enzima e um substrato. Neste teste, a intensidade da reação de cor se relaciona diretamente com a quantidade de antígeno conjugado (Tizard, 1998).

11.2.8.3.ELISA sanduíche indireto de duplo anticorpo

A diferença deste ensaio para o duplo sanduíche é que o segundo anticorpo utilizado é produzido em uma espécie diferente do anticorpo primário. Dessa forma, o anticorpo secundário pode ser detectado usando um conjugado com anticorpos contra o anticorpo secundário, que não reage com o anticorpo adsorvido à placa (primário) (Madruga *et al*., 2001).

11.2.8.4. ELISA direto

O antígeno adsorvido à fase sólida reage diretamente com um anticorpo, específico para o antígeno, ligado a uma enzima, formando um complexo insolúvel. Essa prova é utilizada para detecção de antígenos, entretanto, é um ensaio pobre para pesquisar antígenos brutos. É útil para proceder à titulação de anticorpos conjugados às enzimas marcadas utilizando antígenos purificados (Madruga *et al*., 2001).

No ELISA direto utiliza-se a IgG e o conjugado produzido em apenas uma espécie animal, e requer um IgG e seu respectivo conjugado, para cada vírus a ser detectado, e o que o torna mais caro (Almeida & Lima, 2001).

11.2.8.5. ELISA Indireto

É um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soroepidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (Madruga *et al*., 2001).

Neste utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará (Almeida & Lima, 2001).

Vários métodos de ELISA indiretos usando vírus inteiro ou proteínas MVV recombinante têm sido descrito (Reyburn *et al*., 1992; Carey *et al*., 1993). Permite a detecção de estirpes de um mesmo vírus que embora sejam sorologicamente relacionadas apresentam maior variação entre si (Almeida & Lima, 2001).

11.2.9. Dot-Blot

O dot-imunoblotting pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras em razão da presença de ação

de antígeno ou anticorpo, ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. Amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose e secas, a seguir a membrana é bloqueada, coberta com anticorpos e analisada por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada, como método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do imunoblotting após a transferência do antígeno para a membrana. Por diluição seriada do antígeno, a sensibilidade de um dado sistema pode ser determinada (Pinheiro, 2001).

11.2.10. Western blotting ou Imunoblotting

O Imunoblotting, em princípio, pode ser delineado como método onde proteínas (anticorpos séricos ou plasmáticos) podem ser imobilizadas em uma membrana e transferidas por capilaridade, difusão ou forças elétricas. As forças de ligação da membrana podem ser de natureza covalente ou não-covalente. O material protéico deve ser separado antes da transferência por eletroforese. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor a reação. Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa vem sendo utilizada com lentivírus de pequenos ruminantes somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas virais dos lentivírus dos pequenos ruminantes (Pinheiro, 2001).

11.3. Fixação de Complemento

Klein *et al*. (1985), utilizando fixação de complemento ou neutralização para detecção de ovinos naturalmente infectados pelo MVV demonstraram resultados menos sensíveis que o IDGA.

12. Controle e Profilaxia

Métodos de controle da MV incluem o sacrifício de todos os ovinos soropositivos, algumas vezes, de cordeiros de mães soropositivos e repetição de testes a intervalos de aproximadamente seis meses. Até que no mínimo três testes negativos sejam obtidos. Como alternativa, os cordeiros podem ser isolados ao nascimento, não tendo acesso ao colostro e leite de ovelhas positivas, sendo submetidas a aleitamento artificial (Moojen, 2001).

Até o presente momento, a única forma efetiva de controlar a infecção pelo lentivírus ovino tem sido pela remoção dos animais infectados ou pela prevenção da difusão do agente (de la Concha-Bermejillo, 1997). As medidas sanitárias adotadas para controle / erradicação da infecção por LVPR estão diretamente relacionadas ao tamanho, tipo de exploração, manejo e grau de infecção de rebanho. Entretanto medidas sanitárias básicas incluem:

- Testes sorológicos sensíveis e específicos semestrais em todos os ovinos;
- Eliminação de animais reagentes;
- Separação dos cordeiros nascidos de fêmeas infectadas logo após o nascimento, antes da ingestão de colostro e eliminação da fêmea;
- Manutenção dos cordeiros em isolamento, os alimentando artificialmente quando possível, em função do manejo adotado pela propriedade;
- Adquirir somente ovinos comprovadamente negativas à infecção por LVPR e oriundos de rebanhos negativos;
- Evitar o uso de sêmen de machos infectados;
- Estabelecer uma ordem de ordenha em rebanhos de ovinos leiteiros, ordenhando fêmeas jovens e negativos antes de fêmeas velhas e positivos (Reischak, 2000).
- Uso da transferência de embriões de fêmeas soropositivas de alto valor zootécnico para receptoras comprovadamente soronegativas

JUSTIFICATIVA

Para o controle de MV é necessário o uso de um diagnóstico confiável e este depende da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados, bem como do custo do exame para o proprietário.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para detectar os anticorpos contra MVV, como por exemplo, o ELISA indireto, que apresenta uma alta sensibilidade e reprodutibilidade podendo ser utilizado para grande número de amostras,bem como apresenta resultados rápidos, porém sua rotina diagnostica é dificultada no Brasil, pois não existe um kit de ELISA disponível e comercializado, tendo que utilizar reagentes importados.

HIPOTÉSE CIENTÍFICA

O teste de ELISA indireto com o antígeno produzido é mais sensível do que o IDGA, permitindo detectar um maior número de animais com anticorpos contra o MVV no sangue quando comparados com o teste de rotina.

OBJETIVOS

GERAL:

Produzir e padronizar um antígeno para ELISA que possibilite o diagnóstico do MVV, de forma rápida, sensível e segura.

ESPECÍFICO:

- Produzir um antígeno (Ag) através da inoculação de um isolado do MVV padrão cepa K1514 em cultura de fibroblastos de membrana sinovial de caprinos;
- Semi-purificar o vírus por centrifugação;
- Padronizar a concentração de Ag a ser usada, na fase sólida do ELISA indireto;
- Padronizar a diluição do soro e conjugado a serem utilizados no ELISA;
- Estabelecer o ponto de corte a ser utilizado no teste

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo de células

Cultivo de células de membrana sinovial de caprinos, realizado para produção de massa viral e titulações de lentivírus ovino, foi obtida por “explants” a partir de cabrito comprovadamente negativo para LVPR, depositado assepticamente em garrafas de 25 cm^2, com 7 ml de Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescidos de soro fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina e anfotericina e cultivadas a 37 ºC até a formação de monocamadas, seguido de subcultivos por tripsinização das células (Crawford *et al*., 1980).

2. Titulação do Vírus

Suspensões virais foram tituladas em microplacas, por diluições decimais em meio com 2% SFB, utilizando-se seis repetições por diluição. Primeiramente adicionaram-se 50 µl de suspensão de células de MSC obtidas por tripsinização, contendo 2,5 x 10^4 células/cm^2 em MEM com 10% de SFB. Após 6h foram colocadas 50 µl da diluição do vírus, que variou de 10^{-1} a 10^{-8}. Foram mantidos poços de controle negativo (células MSC e MEM 2% SFB). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 ºC com 5 % de CO_2 durante 14 dias.

3. Vírus e Suspensão Viral

Para a produção da suspensão viral utilizou-se amostra padrão (MVV-K1514)[1] com título inicial de $10^{-4,5}$ $TCID_{50}$/ml. Monocamadas de MSC com 70% de confluência (11ª passagem) cultivada em garrafas Roller de 830 cm2 de superfície de cultivo. Após um período de 48h, as monocamadas de MSC foram inoculadas com 15 ml de suspensão viral com 200 DFS/ml diluída em MEM sem SFB, e após incubação por 45 min, adicionou-se 135 mL de MEM com 5 % de SFB sendo observadas diariamente. Coletou-se o sobrenadante por três vezes no 10º e 15º e no 25º dia usando o critério de 50 % de lise celular. Os sobrenadantes foram coletados, bem como o tapete restante da última coleta, os quais foram congelados a -20ºC.

4. Purificação do vírus e produção do antígeno

Na produção do antígeno, os sobrenadantes das coletas iniciais e o conteúdo da garrafa congelada sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento e então clarificados por centrifugação a 3000 g (rotor IEC 216) a 5 ºC por 40 min. A suspensão clarificada foi precipitada com Polietilenoglicol (PEG-8000) a 8 % por 18 h a 4 ºC, sob lenta agitação, seguida de nova centrifugação a 4 ºC a 12000 g (rotor Sorvall GSA) por 1 h (Reis & Leite, 1994). O sedimento foi suspenso em Tampão Tris-HCl (TNE) (10,0mM tris-HCl, pH 7,4; 10,0mM NaCl;1,0mM EDTA) na proporção de 10 % do volume original da suspensão viral e ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42000 g (rotor Beckman SW 41ti) por 105 min a 3 ºC (Houwers *et al*., 1982). O sedimento foi ressuspendido em PBS (pH 7,4) contendo 2 x 10^{-4} mol\L de phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o antígeno mantido a 4 ºC, até a realização dos ensaios imunoenzimáticos (Pinheiro, 2001).

5. Técnica do ELISA indireto

5.1. Otimização das concentrações dos reagentes

a) Antígeno - Foram testadas cinco diferentes concentrações de proteína do antígeno viral, que variou de 2,0 a 0,125 μg\poço. A concentração ótima para o antígeno viral foi determinada pela mais baixa concentração que pode demonstrar a positividade da reação para qualquer diluição do soro positivo.

b) Soro e conjugado - Foram testadas quatro diluições de soros (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) frente a diluição do conjugado anti-sheep IgG Peroxidase (1:1000)[2]. A diluição ótima do soro foi a que apresentou a maior diferença na leitura entre os positivos e negativos na concentração ótima do antígeno (Pinheiro, 2001).

5.2.. Controle de qualidade e repetibilidade do teste

O teste de ELISA foi padronizado como recomendado pela FAO\OIE (Wright *et al*., 1993). Foram incluídos controles positivo (pool de soros positivos na IDGA), negativo (pool de soros negativos), de antígeno e substrato. Os soros foram testados em duplicata, sendo os resultados expressos em densidade óptica (DO),

[1] Amostra gentilmente cedida pela UFRPE oriunda do Laboratoire Associé de Recherches sur les Petitis Rumints- INRA-ENVL-France

[2] Produzido em jumento. Sigma A-3415

convertidos na razão entre a DO da amostra e a DO controle positivo (percentual de positividade-PP) (Motha *&* Ralston., 1994).

O ensaio imunoenzimático foi realizado a 37 ºC usando 100 μl de cada componente da reação, com exceção do H_2SO_4 (ácido sulfúrico) que se utilizou 50 μl. O antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH9, 6), o soro e o conjugado em PBS (pH 7,4) e o substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH5,0). As placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9 %, 0,05 % de Tween 20) entre as etapas.

Para realização do ELISA, revestiu-se cada poço da placa[3] com a concentração ótima do antígeno pela incubação por 1 h a 37 ºC. Após bloqueio com leite em pó desnatado 2,5 % em PBS-T por 1 h, os soros controles e teste diluídos a 1:100 foram distribuídos em duplicata e incubados por 1 h. Em seguida, adicionou-se o conjugado na diluição de 1:1000 e incubou-se por 1 h. A reação foi revelada pela incubação por 15 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz com OPD (5 μl de H_2O_2; 2 mg de O-phenylenediamine)[4] seguida de adição de inibidor da reação (H_2SO_4 4N). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro[5].

6. IDGA

Foi utilizada a técnica de IDGA[6] descrita por Abreu *et al*. (1998), realizada em agarose a 1%, utilizando 20 μl do soro teste e 20 μl do soro controle positivo, e 20 μl do antígeno na cavidade central. Em seguida, foram acondicionadas em câmara úmida, à temperatura ambiente (25 ºC) por 48 h. As reações foram avaliadas pela presença de linha de precipitação, obtida entre o antígeno e o soro controle positivo.

7. Soro

O soro foi obtido de amostras de sangue coagulado centrifugado e estocado a –20 ºC. Foram utilizadas 16 amostras de soros provenientes de rebanho de Fortaleza-CE com resultados sorológicos negativo para determinar o ponto de

[3] Placa flexível de 96 well de vinyl Costar ® cat nº2545
[4] OPD sigma P-6787
[5] Espectrofotômetro Metertech Σ960

corte do ELISA (média das PP do negativo mais três desvios padrões do PP) e 175 soros foram testados para comparação.

8. Custo de produção do teste de ELISA

Na estimativa do custo de produção, procurou-se abranger todos os gastos utilizados na cadeia produtiva do teste (anexo 1). Foram considerados os custos desde a produção das células utilizadas no cultivo primário até a realização final do teste. Foram incluídos os valores referentes aos custos diretos fixos e variáveis e custos indiretos fixos e variáveis.

9. Analise Estatística

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos no ELISA indireto, tomando como padrão o teste de IDGA utilizando antígeno comercial. Foram avaliados a sensibilidade comparada, especificidade comparada, valor preditivo positivo e negativo e precisão (Madruga *et al*., 2001). Os resultados dos teste foram comparados através do teste do Qui-Quadrado com correção de Yates (χ^2) (Tyler & Cullor, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos dois testes.

[6] Os kits contendo o antígeno, soro padrão positivo e o ágar, utlizados no teste diagnóstico, foram adquiridos do Laboratório de Biotecnologia para Saúde Animal (Biovetech)- Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de MSC, infectadas com MVV, apresentaram os primeiros sinais de infecção 96 h após a inoculação viral, com a formação de sincícios caracterizados por células gigantes multinucleadas e lise celular.

O antígeno foi testado por IDGA frente ao soro padrão anti-MVV p-28[7] e o mesmo não apresentou nenhuma linha de precipitação após 72 h. No entanto, após a diluição do antígeno o teste apresentou uma linha nítida entre o antígeno e os poços controles positivos. Dados semelhantes foram encontrados por Pinheiro (2001) e Abreu (1998) que encontraram duas linhas de difícil visualização. Entretanto, Castro (1998) verificou a presença de duas fortes linhas de precipitação.

A concentração protéica do antígeno foi de 0,5 mg/mL, valor inferior ao encontrado por Pinheiro (2001) de 2,21 mg/mL, e por Castro (1998) que encontrou 1,9 mg/mL, ambos trabalhando com antígeno completo para o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).

Na padronização dos testes obteve-se um protocolo capaz de ter um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) com boa resolução, resultando em reações de alto *background*.

O ELISA foi padronizado para obter diferença máxima entre a DO soro positivo e negativo. A concentração ótima do antígeno foi 2 μg/mL, concordando com os dados encontrados por Vitu *et al*. (1982) e inferior ao encontrado por Houwers *et al*. (1982), que observaram 3 μg/mL de antígeno. A melhor diluição do soro foi de 1:100 (Figura 3), discordando dos valores encontrados por, Vitu *et al*. 1982, Castro,1998 e Pinheiro, 2001 que encontraram a diluição ótima a, 1/80, 1/400 e 1/50 respectivamente. Os 16 soros provenientes de rebanho negativo foram retestados por IDGA e apresentaram resultados negativos. O ELISA teve ponto de corte de 0,897 de positividade (Tabela 1), o qual superior ao observado por Motha & Ralston (1994) que encontrou uma valor de 0,494 e inferior ao ponto de corte encontrado Houwers et al. (1982) que observaram o valor de 1. Com base neste critério de classificação observou-se que o ELISA detectou maior número de soros positivos (40) que o IDGA (11) (Tabelas 2 e 3).

[7] Institut Pourquier

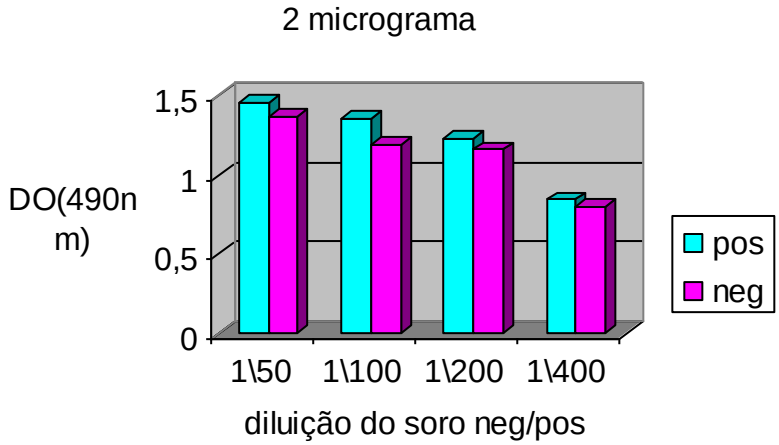

Figura 4. Determinação da quantidade de antígeno (2 μg/mL) e diluição do soro empregado no teste de ELISA para o diagnóstico de Maedi-Visna Vírus (MVV)

Tabela 1. Determinação do ponto de corte do ELISA para diagnóstico de Maedi-Visna Vírus

	DO*	PP**
Média	0,471	0,471
Desvio Padrão (DV)	0,274	0,142
Média +3DV	1,293	0,897

* Densidade óptica (490 nm)

** Percentual de positividade

Tabela 2. Resultados de 175 amostras de soro ovino pelos testes IDGA e ELISA para o diagnóstico sorológico de MVV

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA	11	6,3	164	93,7	175
ELISA*	40	22,9	135	76,6	175

*Pos(PP > 0,897 em relação ao padrão positivo)
Neg (PP < 0,897 em relação ao padrão positivo)

Tabela 3. Comparação dos resultados dos soros ovinos testados pelo IDGA e pelo ELISA para o MVV.

		IDGA		
		Positivo	Negativo	Total
ELISA	Positivo	10	30	40
	Negativo	1	134	135
	Total	11	164	175

X^2 26,85 (p<0,001) Kappa:0,32

Foi utilizado como controle positivo o soro padrão positivo anti-MVV p-28 do kit de IDGA do Instituto Pourquier, que apresentou leituras positivas, não observado por Pinheiro (2001), que usando o soro reagente do kit americano[8] encontrou um valor negativo, o que pode ser justificado pelo fato deste soro ser contra gp135, e o antígeno ser pobre em gp 135. No caso de ELISA pode-se inferir que houve positividade devido o soro ser contra p28 e o antígeno com vírus completo possuir uma concentração de p28 capaz de detectar positividade. Celer Jr. *et al*. (1998) verificaram, por immunoblotting, que a gp 135 foi evidente em soros extremamentes positivos e, portanto, não a utilizaram para confirmação de diagnóstico. As glicoproteínas são relativamente instáveis e passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção do antígeno (Rimstad *et al*., 1994), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde podem ocorrer perdas de até 50% destas proteínas virais (McGrath *et al*. 1978), ou até mesmo perdas espontâneas das partículas virais liberadas depois de vários dias de cultivo (Castro, 1998).

Para comparação de teste o ideal é se dispor de um teste de referência, que segundo Knowles (1997) são imunoprecipitação e Western blot, como critério independente e seguro de classificação da população em verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Pelas particularidades da patogênese dos LVPR, a determinação do verdadeiro status dos animais é difícil, pois a restrição da replicação viral torna o isolamento incerto (Castro,1998). Por isso, foi adotado o critério de cálculo da sensibilidade e da especificidade com base nos resultados dos próprios testes sorológicos, o que pode penalizar certos testes.

O IDGA foi escolhido como teste padrão para o diagnóstico de MVV por ser o teste recomendado pelo OIE para o exame diagnóstico e para comercialização de pequemos ruminantes (OIE,1996).

Na comparação com o IDGA, o ELISA apresentou 91% de sensibilidade, 82% de especificidade, 82,3% de concordância, valor preditivo positivo 25%, valor preditivo negativo:99%, com precisão de 88%.

Os resultados mostraram maior sensibilidade que a IDGA. Comparando o protocolo de ELISA em relação à IDGA verificou-se que o ELISA detectou 22,9 % mais animais positivos, enquanto Simard & Briscoe (1990), Castro (1998), Celer Jr. *et al*. (1998) e Pinheiro (2001) comparando os mesmos testes verificaram 15,5 %, 18,9 %, 15,5 % e 44,5 %, respectivamente. Entretanto, utilizando o ELISA com sistema de amplificação do sinal enzimático pelo sistema avidina-biotina, Castro (1998) detectou cerca de 84% a mais que o teste IDGA, porém com aumento do custo e do tempo do teste. Deve-se considerar, além de fatores inerentes aos testes, que existam animais que apresentam resposta imunológica seletiva para determinados antígenos (Johnson *et al*., 1983; Rimstad *et al*., 1994). O antígeno utilizado no IDGA não recebeu tratamento, sendo constituído predominantemente de glicoproteínas (Adams & Gorham, 1986). A relativa instabilidade das glicoproteínas, passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção de antígenos a partir do vírus completo (Rimstad *et al*., 1994), bem como o processamento do ELISA, principalmente as lavagens com PBS contendo Tween 20, podem ter exposto certos epítopos, para os quais certos animais elaboraram resposta imunológica de intensidade indetectável pelo IDGA ou ELISA.

A especificidade de 82% do ELISA decorreu, provavelmente, da forma imperfeita de classificação dos verdadeiros negativos, pois o grupo de animais empregados na determinação do ponto de corte era negativo apenas pelo IDGA que pode apresentar resultados falsos negativos ou detectar o vírus somente depois de alguns meses (Castro,1998).

Apesar da utilidade das provas sorológicas na identificação de animais infectados por LVPR, tem-se observado um número significativo de animais infectados que são soronegativos (Rimstad *et al*., 1993; Chebloune *et al*., 1996), fazendo-se necessário o uso de técnicas diretas de diagnóstico, que identifiquem

[8] Caprine Arthritis-Encephalitis/ovine progressive Pneumonia Antibody test kit veterinary diagnostic Technology, INC®, USA

antígenos virais ou seu material genético, antes mesmo dos animais produzirem resposta imunológica detectável pelos teste sorológicos. Em função da restrição da expressão genética dos LVPR e da dificuldade de identificação segura por provas imunoquímicas, tem-se desenvolvido a PCR como alternativa para diagnóstico de LVPR, que não tem sido ainda empregada em teste de rotina (Chebloune *et al*., 1996; Castro, 1998)

Chebloune *et al*. (1996) relatam um número significativo de animais infectados com sorologia negativa (falsos negativos), mas deve ser considerado que a resposta imune contra LVPR apresenta variações individuais (Rimstad *et al*.,1994). Em consequência de uma maior sensibilidade, o ELISA desenvolvido mostrou-se um teste mais viável que a IDGA para utilização no controle desta infecção.

A menor sensibilidade do IDGA a despeito da diferença na produção de anticorpos pode ser explicada em parte pelo mecanismo de interação antígeno-anticorpo. Embora os testes imunoenzimáticos requeiram a ligação de somente um simples epítopo para obter um resultado positivo, a precipitação em gel de Agar requer interações múltiplas antígeno-anticorpo. Pequenas alterações antigênicas na gp 135 podem desta forma influenciar a sensibilidade do teste de IDGA. Este efeito juntamente com o requerimento de grandes quantidades de moléculas reagentes de antígeno e anticorpo é a causa mais comum da limitada sensibilidade do teste de IDGA (Celer jr. *et al*., 1998)

A análise estatística entre os resultados do IDGA e do ELISA indireto não mostrou uma concordância perfeita (82%), fato também observado por Castro (1998) que encontrou uma concordância de 87% e por Pinheiro (2001) de 75% de concordância. Tem sido recomendada a realização de um teste inicial de IDGA com posterior reteste dos animais negativos utilizando o ELISA e podendo-se, ainda, associar com immunoblotting dos animais duvidosos (Celer Jr. *et al*., 1998).

A variedade entre os resultados dos testes (IDGA X ELISA) neste caso pode ser justificada pela diferença da sensibilidade, já que se supõe que o antígeno deste ELISA tem como principal componente a p28 assim como o antígeno do kit do IDGA. A diferença de sensibilidade observada entre os dois testes pode ser indicativa de flutuação da resposta imune contra proteínas codificadas pelos genes *gag* e *env* durante a evolução da doença (Houwers & Nauta, 1989; Hanson *et al*., 1996).

CONCLUSÕES

O ELISA desenvolvido apresentou alta sensibilidade e boa especificidade, podendo ser utilizado como teste diagnóstico para MVV nos ovinos do Ceará - Brasil, detectando um maior número de animais positivos que o IDGA. O protocolo do ELISA desenvolvido utiliza baixa quantidade de reagentes e realiza testes de 42 amostras por placa. Assim, quando comparado com o IDGA, este foi superior em relação à sensibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A. SOUSA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o do vírus maedi-visna para imunodifusão em Ágar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 18, n. 2, p. 57-60, 1998.

ADAMS, D.S. and GORHAM, J.R., The gp 135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p 28 in immunodiffusion serology. **Research veterinary Science,** v.40, p.157-160,1986.

ALKAN, F., TAN, M.T.A A comparative study on the diagnosis of Maedi-Visna infection in serum and colostrum samples using agar gel immunodiffusion (AGID) technique. **Dtsch Tierarztl wochenschr,** v. 105, p.276-278, 1998.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia.** Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001.

ALMEIDA, N. C. **Isolamento e identificação do vírus Maedi-Visna através de microscopia eletrônica de transmissão de animal comprovadamente soropositivo pelo IDGA.** Fortaleza, 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de veterinária, Universidade Estadual do Ceará.

ALMEIDA, N. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Levantamento sorológico de lentivírus ovino em animais destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. **Anais da IV Semana Universitária da UECE, Fortaleza:** Universidade Estadual do Ceará, 1999, v.1, p. 300-300.

ASSIS, A P.M. **Evidência sorológica da ocorrência de lentivírus (Maedi-Visna/ Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará de 1991 a 1993.** Belo Horizonte–MG: 1994, 61p. Dissertação (Mestrado)- Escola de Veterinária- Universidade Federal de Minas Gerais.

BANKS, K. L.; ADAMS, D. L.; McGUIRE, T. C.; JAM, N; CARLSON, B. S. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and gotas by progressive pneumonia virus. **American Journal Veterinary Research**, v. 44. n. 2, p. 2307-2310, 1983.

BERTONI, G., ZAHNO, M.L., ZANONI, R., VOGT, H. R.,PETEKHANS; E., RUFF,G., CHEEVERS, W. P., SONIGO, G. Antibody reacticity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis – encephalites virus gp 38 transmenbrane protein associates with develpment of arthritis. **Journal Virology**, v. 68, p. 7139-7147, 1994.

BLACKLAWS, B. A., BERRIATUA, E., TORSTEINSDOTTIR, S., WATT, N. J., DEANDRES, D., KLEIN, D., HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentivirose. **Veterinary Microbiology,** v.101, p. 199-208, 2004

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitration of microgram quanties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analisy biochemistry**, v. 72, n. 1., p. 248-54. 1976

BRODIE, S. J., de la CONCHA – BERMEJILLO, A., SNOWDER, G. D., DE MARTINI, J. C. 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.

BROWN, C. In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. **Veterinary Pathology.** v.35, n.3, p.159-167, 1998.

CAREY, N.; DALZIEL, R. G. The biology of Maedi-visna virus. An overview. **Brazilian Veterinary Journal,** v. 149, p., 437-454, 1983.

CAREY, N.; ROY, D. J., DALZIEL, R. G. Use of recombinant gp 135 to study epitopespecific antibody responses to Maedi-Visna virus. **Journal of Virological Methods,** v. 43, p. 221-323, 1993.

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

CASTRO, R. S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, Perfil sorológico e inferências filogenéticas**. Belo Horizonte. MG: UFMG – Escola de Veterinária, 1998. 132p. Tese (Doutorado)

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; MARTINS, A.; GOUVEIA, A. M. G. Isolamento e identificação pela Imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da Artrite-Encefalite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 235-240, 1999.

CELER JR, V., CELER, V., NÉMCOVÁ, H., ZANONI, R. G., PETERHANS, E. Serologic Diagnosis of ovine lentivirus by whole virus ELISA and AGID test. **Journal of Veterinary Medicine,** v. 45, p. 183-188, 1998.

CHEBLOUNE, Y., SHEFFER, D., KARR, B.M., STEPHENS, E., NARAYAN, O . Restrictive type of replication of Ovine/Caprine lentiviruses in ovine Fibroblast Cell Cultures. **Virology**, v.222, p.21-30, 1996.

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

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C.; Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus. **Clinical Microbiology Veterinary**, v. 9, p. 100-117, 1996.

COFFIN, J. M. **Retroviridae: the virus their of replication.** In: FIELDS, B. N,; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CNANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. 3 ed. Fields Virology, Philadelphia, Lippincoh-Raven, p. 1767-1847, 1996.

COMINI, R. Produção de ovinos e caprinos em Mato Grosso: **O Berro**, Belo Horizonte, Novembro de 2004,p. 34-39.

CONSTABLE, P. D.; MEIER, W. A.; FOLEY, G. L.; MORIN, D.; CUTLIP, R. C.; ZACHARY, J. F. Visna-like disease in a ram with chronic demyelinating encephalitis. **Journal American Veterinary Medicine Association.** v. 208, p. 117-120, 1996.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v.207, p. 997-999, 1980.

CUTLIP, R. C., LAIRD, G. A. Isolation and characterization of a virus associated with progressive pneumonia (Maedi) of sheep. **American Journal Veterinary Research**, v. 37, p. 1377-1382, 1976.

CUTLIP, R. C., JACKSON, T. A., LAIRD, G. A. .Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. **American Journal Veterinary Research.** v.38, p. 1081-1084, 1977.

CULTIP, R. C., HAWARD, D., LEHMKUHL, H. D., SCHMERR, M. J. F., BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia maedi-visna in sheep. **Veterinary Microbiology**, v.17, p.237-250, 1998.

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

DE BÔER, G. F. Zwoergerziekte virus, the causative agent for progressive intestitial pneumonia (Maedi) and meningo-leucoencephalitis (visna) in sheep. **Research Veterinary Science**, v. 18, p. 15-25, 1975.

de la CONCHA – BERMEJILLO, A., BRODIE, S. J., MAGNUS – CORRAL, S., BOWEN, R. A., DOMARTINI, J. C., Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypicalty distinct lentiviruses. **Journal Acquired immune deficient syndrome Human Retrovirol**. v. 8, p. 116-123, 1995.

De la CONCHA – BERMEJILLO, A. Maedi-visna e ovine progressive pneumonia. **Veterinary Clinic North American: Food Animale Practice.** v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.

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

EXTRAMIANA, A.B, GONZALEZ, L., CORT BARRIA, N., GARCIA, M., JUSTE, R.A. Evaluation of a PCR tecnique for the detection of Maedi-Visna proviral DNA in blood, milk and tissue samples of naturally infected sheep. **Small Ruminant Research**, v.44, n.2, p.109-118, 2002

FEVEREIRO, M.; BARROS, S.; FAGULHA, T. Development of a monoclonal antibody blocking – ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. **Journal of Virological methods,** v. 81, p. 101-108, 1999.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. **Retroviridae: The viruses and their replication.** IN. Fields Virology. Ed. Lippincotl-Raven, 3 ed., v. 1, p. 1767-1847,1996.

FIENI, F., ROWE, J., VAN HOOSEAR, K., BURCOA, C., OPPENHEIM, S., ANDERSON, G., MURRAY, J., BONDURA, R. Presence of caprine arthritis – encephalitis virus (CAEV) infected cells influshing media following ociductal – stage embryo collection. **Theriogenology,** v. 57, p. 931 – 940, 2002.

FIENI, F., ROWER, J., VAN HOOSEAR, K., BURUCOAC, C., OPPENHEIM, S., ANDERSON, G., MURRAY, J., BONDURANT, R., . Presence of caprine arthritis – encephalites virus (CAEV) pro viral DNA in genital tract tissue of supervilated dairy goat does. **Theriogenology,** v.59, p. 1515 – 1523, 2003.

GENDELMAN, H. E., NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKPF, S., KENNEDY, P. G. E., GHOTBI, Z., CLEMENTS, J. E., STANLEY, J., PEZESHKPOUR, G. Tropism of

sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **Journal Virology.** n. 58, v. 1, p. 67-74, 1986.

GEORGSSON, G. and PALSSON, P. A.. The histopathology of maedi, a slow viral pneumonia of sheep. **Veterinary Pathology**, v.8, p. 63–80,1971.

GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. **Proceedings National Academy Science**. USA, v. 83, p. 4007-4011, 1986.

HAASE, A. T., Pathogenesis lentivirus infection. **Nature**, v. 322, n. 10, p. 130-136 1986.

HAASE, A. T.; GARAPIN, A. C.; FARAS, A. J.; VARMUS, H. E., BISHOP, J. M., Characterization of nucleic acid of the visna virus RNA dependent DNA polymerase. **Virology**, v. 57, p. 251-258, 1974.

HANSON, J., HYDBRING, E., OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Acta Veterinaryt Scandinavi**, v.37, n.1, p.31-39, 1996.

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

HARMACHE, A.; VITU, C.; GUINGUEN, F.; RUSSO, P.; BERTONI, G.; PEPIN, M.; VIGNE, R.; SUZAN, M. Priming with tat-deleted Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats form challenge with pathogenic CAEV. **Journal Virology**, v. 72, n. 8, p. 6796-6804, 1998.

HOUWERS, D. J. Experimental maedi-visna control in the Netherlands. In Sharp J. M. Holf-Jorgensen T (eds). Slow virus in sheep, goats and cattle, Luxembourg. **Commission of the European Communities**, p. 115 – 121, 1985.

HOUWERS, D.J., GIELKENS, A.L.J., SCHAAKE JUNIOR, 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 and NAUTA, I.M. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivírus infection. **Veterinary Microbiology**, v.41, p. 6557-6665, 1989.

JAN, C. L., GREENLAND, T., GOUNEL, F., BALLEYDIERS, S., MORNEX, J. F. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after *in vivo* infection by caprine arthritis encephalites virus. **Research Veterinary Science**, v. 69, n. 3, p. 225-231, 2000.

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. **Infectividade Immunology,** v. 2 n.41,p.657-665, 1983.

KENNEDY - STOSKOPF, S. ; NARAYAN, D. Neutralizing anti bodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. **Journal Virology**., v. 59, p. 37-44, 1986.

KLEIN, J. R., MARTIN, J., GRIFFING, S., NATHANSON, N. Precipitating antibodies in experimental visna and natural progressive pneumonia of sheep. **Research Veterinary Science,** v.38, p. 129-133, 1985.

KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinic North American: Food Animal. Practice**, v. 13, p. 1-11, 1997.

KWANG, J; KEEN, J.; CUTLIP, R. C.; KIM, H. S.; de la CONCHA-BERMEJILO A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassays. **Small ruminant Research**, v.16, p. 171-177, 1995.

LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., TAINTURIER, D., CHEBLOUNE, Y. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). V**irus Research**, v.87, p.69-77, 2002

LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., TAINTURIER, D., CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. **Virus Research.** v.79, p.165-172, 2001.

LARSEN, H. J.; HYLLSETH, B.; KROGSRUD, J. Experimental maedi virus infection in sheep: cellular and humoral immune response during three years following intranasal inoculation. **American Journal Veterinary Research,** v. 43, n. 3, p. 384-389, 1982.

LEE, W. C.; McCONNEL, I., BLACKLAWS, B. A. Cytotoxic activity against maedi-visna virus – infected macrophages. **Journal Virology**, v. 68, p. 8331-8338, 1994.

LEE, W. C.; McCONNEL, I., BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of Maedi-visna virus in macrophages and skin cell lines. **Veterinary Microbiology**, v. 43, p. 93-104, 1996.

LERONDELLE, C., GODET, M. MORNEX, J. F. Infection os primary cultures of mammary epithelial cello by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v. 5, n. 30, p. 467-474, 1999.

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTNG, J.; LION, M.; QUERAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R. MORNEX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cell allow the replication of Visna-maedi virus *in vitro*. **Archives of Virology**, v. 140, p. 1-11, 1995.

LEROUX, C., LERONDELLE, C., CHASTANG, J., MORNEX, J. F. RT – PCR detection of lentivirus in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. **Veterinary Research**., v. 28,p. 115-121, 1997.

MADRUGA, C.R., ARAÚJO, F.R., SOARES, C.O.. Princípios , padronização e validação de provas sorológicas. In: **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária**. Editores :Madruga, C.R., Araújo, F.R., Soares, C.O., EMBRAPA gado de corte (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), 145-175., 2001

McGRATH, M., WHITE, O, PINCUS, T., WEISSMAN, I.L. Retrovirus purification: Method that conserves envelop glycoprotein and maximizes infectivity**. Journal Virology**. v.25, p.923-927,1978.

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

MOOJEN, V. **Maedi-Visna dos ovinos**. In: RIET-CORRÊA, F. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. São Paulo: Varela, 2001, v.1. p.138-144.

MOOJEN, V.; BARTH, O. M.; RAVAZOLLO, A. P. Sheep maedi-visna virus ultraestructural characterization of a brazilian isolate. In: V ENCONTRO DE VIROLOGIA, 1995, Ribeirão Preto. **Anais da V virológica**, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Virologia, 1995, v. 1, p. B14.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**. v. 1, p. 77-78, 1986.

MOTHA, M.X. and RALSTON, J.C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. **Veterinary Microbiology,** v.38, p.359-367, 1994.

MSELLI – LAKHAL, L., GUIGUEN, F., FORNAZERO, C., DU, J. FAVIER, C., DURAND, J., GREZEL, D., BALLE Y DIER, S., MORNEX, J. F., CHEBLOUNE, Y. Goat milk cells are highly permissirie to CAEV infection in vitro. **Virology**, v. 259, n. 1, p.67-73, 1999.

NARAYAN, O. AND CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virological,** v. 70, p. 1617-1639, 1989.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **Journal Genetic Virology**, v. 50, p. 69-79, 1980.

Office International des Epizooties., *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. **World Organization for Animal health**,p. 369-373, 1996..

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

PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine Arthritis-Encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnoses **Canada Journal Veterinary**, v. 62, p. 241- 244, 1998.

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

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

PINHEIRO, A. A. Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 68p. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

PRESTON, B., DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retrovial mutation. **Trends Microbiology**, v. 4, p. 16-21, 1996.

QUÉRAT, G.; AUDOLY, G.; SONIGO, P., VIGNE, R. Nucleotide sequence analysis of AS-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. **Virology**, v. 175, p. 434-447,1990.

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

REISCHAK, D. **Lentivirus de pequenos ruminantes imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnosticar sorológico de infecção em ovinos e caprinos.** Porto Alegre, 2000. 132p. Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REYBURN, H. T., ROY, D. J., BLACKLAWS, B. A. SARGAN, D. R., McCONELL, I. Expression of Maedi-visna virus major core protein p. 25: development of a sensitive p. 25 antigen detection assay. **Journal of Virological Methods,** v. 70, p. 1617-1639, 1992.

RIET-CORRÊA, F. **Doenças de Ruminantes e Eqüinos**. v.1. São Paulo: Varela, 2001.

RIMSTAD, E., EAST, N., DeROCK,E., HIGGINS, J., PEDERSEN, N., Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **Archives of. Virology,** v.134, p.345-356, 1994.

RIMSTAD, E., EAST, N.E., TORTEN, M., HIGGINS, J., DeROCK, E., PEDERSEN, N.C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal Veterinary Research**. v.54, n.11, p 1858-1862, 1993.

SCHADE, K.H. **Light Microscopy: technology and application.** 2ed. Munchen: verag moderne industrie, 1995, 70p.

SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizzootiological and a pathological study. **British Veterinary Journal**, v. 110, p. 225-270, 1954.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Archives Gesante Virusforsch**, v. 10, p. 368-381, 1960.

SIHVONEN, L. Early immune responses in experimental maedi. **Research in Veterinary Science**, v.30, p.217-222, 1981.

SIHVONEN, L. Late immune responses in experimental Maedi. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 205-213, 1984.

SIMARD, C. L. & BRISCOE, M. R. Na enzyme – linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparasion to

conventional agar gel immunodifusion test. **Canada of Journal Veterinary Research**, v. 54, n. p. 451-456, 1990.

STRAUB, O. C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. **Comparative immunology and Microbiology and Infectious diseases**, v.27,p.1-5, 2004.

TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSEBLI-LAKAHL, L.; CHETTAB, A ., CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal Veterinary Research**, v.58 n6, p. 579-584,1997.

TIZARD, I. **Introdução á Imunologia veterinária.** 2ed., Roca, São Paulo, 1998. p.545.

TORFASON, E.G., GUDNADOTTOR, 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., MATTHIASDOTTIR, S., VIDARSDOTTIR, N., SUASSON, V., PÉTURSSON, S. Intratracheal inoculation as na efficient croute of experimental infection with maedi visna virus. **Research Veterinary Science**. v.75, p.245-247, 2003.

TORTORA, G.J, FUNKE, B.R., CASE, C.L.**Microbiologia**, 5ed., editora ArtMed, Porto Alegre, 2000, 827p.

TYLER, J.W. and CULLOR, J.S., Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. **Journal American Veterinary Medicine Association**. v. 194, p.1550-1558, 1989.

VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples**. Journal Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 13, p. 301-307, 2001.

VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. **A evolução da caprino-ovinocultura brasileira** [online]. Agosto de 2003 (acessado em Outubro de 2004). Disponível em World Wibe Web: http://www.cnpc.embrapa.br/artigos.

VERWOERD, D. W.; PAYNE, A. L.; YORK D. F.; MYER, M. S. Isolation and preliminary characterization of the Jaagsiekte retrovirus (JSRV). **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v.50, p. 309-316, 1983.

VITU, C.; RUSSO, P.; VIGNE,R.; QUERAT, G.; GIAUFFRET, A. Na ELISA Test For Detection Of Maedi- Visna antibodies. Comparative study with Gel Immunodiffusion na complement fixation test. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease.** v.4, n.5:p .469-481, 1982.

WRIGHT, P.F., NILSSON, E., VANROOIJ, E.M.A., LELENTA, M., JEGGO, M.H. Standardization and validation of enzyme-linked immnuosorbent assay techniques for yhe detection of antibody in infectious disease diagnosis. **Revue Scientifique de l´Office International des Epizooties**.v.12, p. 435-450, 1993.

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

ZINK, M. C., NARAYAN, O., KENNEDY, P. G. E., CLEMENTS, J. E. Pathogenes of visna-maedi and caprine arthritis-encephalites: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. **Veterinary Immunology Immunopathology,** V. 15, p. 1671-1680, 1987.

ZINK, M. C., YAGER, J. A., MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalites virus cellular localization of viral transcripts in tissue of infected goats. **American Journal Pathology**, v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.

ANEXOS

Anexo 1. Custo de produção do teste de ELISA

Para este cálculo levaram-se em conta custos diretos fixos e indiretos (fixos e variaveis). Os custos diretos fixos foram compostos por todo o material de laboratório usado direta ou indiretamente no trabalho, juntamente com a mão-de-obra direta e encargos. Todas as etapas foram calculadas de forma aproximada. Na mão de obra, foi incluído o tempo médio de passagem, troca de meio e inoculação viral de garrafas de acordo com o número e o tipo destas. Todos os componentes, reagentes e meios utilizados foram dimensionados e o gasto calculado proporcionalmente. Quanto aos custos diretos variáveis, computou-se a utilização de material laboratorial reutilizável (vidraria e plásticos), equipamentos, energia direta e material de lavagem. Com relação aos equipamentos, o gasto foi elaborado com base no preço do equipamento novo, vida útil deste e desgaste e depreciação tecnológica por ano.

Com relação aos custos indiretos fixos (administração do laboratório, instalações laboratoriais, transformador de energia, mão de obra indireta) convém salientar que no momento da realização deste trabalho, outros projetos eram realizados conjuntamente, então se estimou um gasto de aproximadamente de 10% . Os custos indiretos variáveis (energia, água) utilizados no projeto também foram estimados em 10% do consumo. Calculou-se, então, que os custos indiretos incidiam em torno de 10% dos custos diretos sendo 3% referente aos custos indiretos e 7% para os custos indiretos variáveis.

Composição do custo do teste ELISA indireto/placa

	Preço R$
CUSTO DIRETO FIXO	
INSUMOS-Material de Laboratório	50,00
Mão de Obra direta	60,00
CUSTO DIRETO VARIÁVEL	
Material de laboratório	10,00
Equipamentos	5,00
Energia	8,00
Material de Lavagem	6,00
CUSTO DIRETO TOTAL	**139,00**
CUSTO INDIRETO FIXO (3% do total dos custos diretos)	4,17
Instalações laboratoriais	
Serviço de limpeza	
CUSTO INDIRETO VARIÁVEL (7% do total dos custos diretos)	9,73
Outros (Iluminação, taxas, esgotos, administração, etc.).	
CUSTO INDIRETO TOTAL	**13,9**
Custo do ELISA indireto (R$)	
Custo total= 42 testes	**152,90**
Custo do teste por amostra em duplicata	**3,64**

Anexo 2. Artigo científico enviado a Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias

Desenvolvimento e padronização de um ELISA indireto para Diagnóstico de Maedi-Visna (MVV) em ovinos.

(Development and standardization of the indirect ELISA for the diagnosis Maedi-Visna in sheep).

Tânia Valeska Medeiros Dantas[1], Suzana Aparecida Costa de Araújo[1], Adriana Lopes Ribeiro[1], Maria Alzira do Carmo Aragão[2], Jean Berg Alves da Silva[1], Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte[1], Raymundo Rizaldo Pinheiro[3], Maria Fátima da Silva Teixeira[1*].

[1] – Laboratório de Virologia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias -PPGCV- Universidade Estadual do Ceará – UECE

Av. Paranjana,1700 Itapery Fortaleza-Ceará-Brasil

CEP:60740-000

[2] – Bolsista de Iniciação Científica EMBRAPA – CNPC, Aluna de Biologia – Universidade Vale do Acaraú-UVA

[3] – Pesquisador PhD EMBRAPA CNPC

Estrada Sobral- Groaíras Km 04 CEP 62011-970 Sobral -Ceará- Brasil

RESUMO: O Maedi-Visna (MV) pode ser diagnosticada por várias formas, como IDGA, Western blot, ELISA, Radioimunoensaio, PCR, sendo o IDGA recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), porém o ELISA é o método de escolha para grandes amostras, mas seu custo elevado, tem dificultado a rotina diagnóstica do ELISA para MV em ovinos. Por isso pesquisas são realizadas para conseguir padronizar e comercializar um ELISA brasileiro para facilitar seu uso na rotina diagnóstica, contudo nosso objetivo foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto para diagnóstico de MV . O antígeno foi produzido por sobrenadantes de cultivo celular de membrana sinovial caprina (MSC) inoculado com o Maedi Visna Vírus (MVV) cepa K1514, que passou por três ciclos de congelamento e descongelamento, logo após foi clarificado por centrifugação a 3000 g por 40 min. A suspensão clarificada foi precipitada por PEG 8000, em seguida foi

* correspondência: tel:0**8532992749 fax: 0**8532992740 email: taniavet@yahoo.com.br

centrifugada a 12000 g por 60 min, o pellet foi ressuspendido em TNE (Tampão Tris-HCl) e ultracentrifugado a 42000 g por 105 min em colchão de sacarose, e o pellet ressuspendido em PBS contendo phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). O ELISA foi realizado em microplacas de 96 poços, com incubação de uma hora a 37 ºC, e lavagens em cada etapa, o revelador foi o-phenylenediamine (OPD) por 15 min ao abrigo da luz. Para a comparação entre os testes de ELISA e IDGA foram utilizadas 175 amostras de soros. A concentração ótima do antígeno foi 2 μg/mL e a melhor diluição do soro foram 1:100. O ELISA detectou um maior número de positivos (41) que o IDGA (11), apresentando uma sensibilidade de 91%, especificidade de 82%. O ELISA apresentou uma sensibilidade melhor que o IDGA, porém a especificidade ficou abaixo do esperado, o que não inviabilizou seu uso como teste de diagnóstico de MVV.

Palavras chaves: ELISA indireto, diagnóstico, lentivírus ovino

SUMMARY: The maedi-visna (MV) it can be diagnosed by several forms, like IDGA, Western Blotting, ELISA, radioimunoassay, PCR, being IDGA recommended by the Office International des Epizooties (OIE), however ELISA is the choice method for great samples, but your high cost, it has been hindering the routine diagnostic of ELISA for MV in sheep. Therefore researches are accomplished to get to standardize and to market a Brazilian ELISA to facility your use in the routine diagnostic, however our objective was to develop and standardize in indirect ELISA for diagnosis of MV. The antigen was produced by supernatants cultivation cellular of membrane goat sinovial (MSC) inoculated with virus maedi visna (MVV) strain K1514, which went by freezing cycles and thawed, soon after it was clarified by centrifugation at 3000 g for 40 min. The suspension clarified was precipitated by PEG 8000 and centrifugation at 12000 g for 60 min, the pellet was resuspended in buffer TNE and layered onto a sucrosecushion by centrifugation at 42000 g for 105 min. The pellet was resuspended in PBS containing phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF).The ELISA was perform in plates of 96 wells, by incubation for 1 h at 37 ºC, and washes between steps, o discloser was the o-phenylenediamine (OPD) for 15 min to the shelter of the light. The tests were compared using the results from 175 serum samples. The great concentration of the antigen was 2 μg/mL and the best dilution of the serum was 1:100. ELISA detected a larger number of positive (23,4%) that IDGA (6,3%), presenting a better sensibilty than IDGA, however the specific was below the expected, what didn´t make unfeasible your use as test of diagnosis of MVV.
Key Words: indirect ELISA, diagnosis, sheep lentivirus

Introdução

O rebanho ovino brasileiro possui aproximadamente 14,2 mil cabeças, sendo que 49% deste encontra-se no Nordeste. A ovinocultura brasileira cresce consideravelmente em todo o país, sendo caracterizada principalmente de pele, lã e carne. A exportação de carne ovina passou de 14,7 mil toneladas em 2000, a de peles acumulou US$ 7,1 milhões. Com a crescente demanda por produtos ovinos, aumenta o número de empresários dispostos a investir nessas atividades, a agroindústria instalada e as tecnologias já disponibilizadas pela pesquisa, capazes de atender aos diversos segmentos da cadeia produtiva, a caprino-ovinocultura brasileira irá se destacar no cenário nacional como atividades de grande impacto sócio-econômica (Vasconcelos e Vieira, 2003).

Porém pouca ênfase é dada ao controle de doenças infecciosas, especialmente o Maedi-Visna (MV). Esta enfermidade tem se disseminado pelo país em grande parte devido ao desconhecimento do grau de comprometimento dos rebanhos e da dificuldade de acesso ao diagnóstico.

De acordo com as resoluções 65\94 e 66\94 do Mercosul, os países membros do bloco devem certificar-se, em caso de exportação e importação de ovinos e caprinos, que o país de origem dos animais seja livre de Maedi-Visna e de CAE há pelo menos três anos. Estas normas sanitárias salientam a importância econômica de controle e erradicação destas enfermidades (Pinheiro, 2001).

MV é uma importante doença de ovinos, responsável por uma infecção persistente resultando em uma doença progressiva e lenta. Os animais acometidos desenvolvem uma doença neurológica degenerativa e inflamatória e/ou uma pneumonia progressiva após um longo período de incubação (Fevereiro *et al*., 1999). O vírus foi isolado pela primeira vez do sistema nervoso central de ovinos em 1960 (Sigurdsson *et al*., 1960) e depois classificado como membro da família Retroviridae. A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de colostro e leite infectado. O Maedi-Visna Vírus (MVV) infecta principalmente células da linhagem monócito / macrófago (Narayan e Clements, 1989). A replicação viral e a expressão gênica são reguladas em parte pelos fatores de ativação e maturação de monócitos. As células maturam para macrófago, e o vírus começa a replicar (Narayan *et al*., 1980).

A primeira resposta humoral no MVV é detectada em torno da terceira semana e está principalmente dirigida contra a proteína do capsídeo; por volta da quinta semana são produzidos anticorpos contra as demais proteínas (do nucleocapsídeo, matriz transmembranária e de superfície) (de la Concha – Bermejillo *et al*., 1995). Segundo Vitu (1982) o teste de IDGA é capaz de identificar animais experimentalmente infectados como MVV cerca de quatro a cinco meses após a infecção, sendo que quando comparado com ELISA mostrou resultados

bastante correlacionados, apesar de quando o teste utilizado é o ELISA a infecção pode ser identificada de forma mais precoce (sete semanas pós período de Incubação).

As perdas econômicas são grandes, decorrentes de falhas reprodutivas, morte, diminuição da produção Láctea e perda de peso dos animais. Por isso, se faz necessário o controle desta doença, e este depende da sensibilidade e especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial. Vários métodos tem sido desenvolvido para detectar anticorpos contra MVV incluindo imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Cutlip *et al*., 1977), recomendado pela OIE, que apesar de boa especificidade pode apresentar resultados falso negativos (Knowles, 1997), fixação de complemento e neutralização de vírus (Torfason *et al*., 1992), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Houwers *et al.*, 1982) e imunoblot (Torfason *et al*., 1992). Devido ELISA ter um alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade tornou-se o método de escolha para um grande número de amostra, porém o uso de antígeno importado tem dificultado rotina diagnóstica devido o custo elevado do kit. As vantagens do ELISA, são estabilidade e pequeno volume de reagentes, resultados de natureza quantitativa, possibilita rápida execução diagnóstica, baixo nível de perigo biológico, trabalha um grande número de amostras sendo também usado para estudo epidemiológico (Almeida e Lima, 2001)

Por isso, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto para a detecção de anticorpos, em ovinos, contra MVV, utilizando antígeno experimental preparado a partir de vírus completo, de forma comparativa com o IDGA comercial, tentando alcançar um teste com custo compatível para testar grande número de animais.

Material e Métodos

Purificação do vírus e produção do antígeno

Na produção do antígeno, foram utilizados sobrenadantes de cultivo celular de MSC infectados com amostra padrão (MVV-K1514)[9] com título inicial de $10^{4,5}$ $TCID_{50}$/ml. Os sobrenadantes e o tapete celular passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento, clarificados por centrifugação a 3000g (rotor IEC 216) a 5ºC por 40 minutos, seguida de precipitação com PEG-8000 a 8% por 18h a 4ºC, e subsequente centrifugação a 4ºC a 12000g (rotor Sorvall GSA) por uma hora (Reis e Leite, 1994). O sedimento foi ressuspendido em TNE (10,0mM tris-HCl, pH 7,4; 10,0mM NaCl;1,0mM EDTA) na proporção de 10% do volume original da suspensão viral e foi ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42000g (rotor Beckman SW 41ti) por 105 min a 3ºC (Houwers *et al*., 1982). O sedimento foi ressuspendido em PBS (pH

7,4) contendo 2 x 10^{-4} mol\L de *phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF). A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e o antígeno mantido a 4ºC, até a realização dos ensaios imunoenzimáticos (Pinheiro, 2001).

Técnica do ELISA indireto

Otimização das concentrações dos reagentes

Foram utilizadas concentrações de 2,0 a 0,125 μg\mL de proteína vírica. A concentração ótima para o antígeno viral foi determinada pela mais baixa concentração que pode demonstrar a positividade da reação para qualquer diluição do soro positivo

Foram testadas quatro diluições de soros (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) frente a diluição (1:1000) do conjugado anti-sheep IgG Peroxidase conjugate[10]. A diluição ótima do soro foi determinada pela diluição que a apresentou a maior diferença nas leituras entre os positivos e negativos para a concentração ótima do antígeno (Pinheiro, 2001).

Controle de qualidade e repetibilidade do teste

ELISA foi padronizado como recomendado pela FAO\OIE (Wright *et al*., 1993). Foram incluídos controles positivo (pool de soros positivos na IDGA), negativo (pool de soros negativos), de antígeno e substrato. Os soros foram testados em duplicata, sendo os resultados expressos em densidade óptica (DO), convertidos na razão entre a DO da amostra e a DO controle positivo (percentual de positividade-PP) (Motha *et al*., 1994).

O ensaio imunoenzimático foi realizado a 37ºC usando 100 μl de cada componente da reação. O antígeno foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH9,6), o soro e o conjugado em PBS (pH 7,4) e o substrato foi preparado em tampão citrato-fosfato (0,1M, pH5,0). As placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%, 0,05% de Tween 20) entre as etapas.

Para realização do ELISA, cada poço da placa[11] foi revestido com a concentração ótima do antígeno pela incubação por uma hora a 37ºC. Após bloqueio com leite em pó desnatado 2,5% em PBS-T por uma hora, os soros controles e teste na diluição de 1:100 foram distribuídos em duplicata e incubado por uma hora. Então adicionou-se o conjugado em 1:1000 e incubou-se por uma hora. A reação foi revelada pela incubação por 15

---

[9] Amostra gentilmente cedida pela UFRPE oriunda do Laboratoire Associé de Recherches sur les Petitis Rumints- INRA-ENVL-France

[10] Produzido em jumento. Sigma A-3415

min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz com OPD (5 µl de H_2O_2;2 mg de O-phenylenediamine)[12] seguida de adição de inibidor da reação (H_2SO_4 4 N), e leitura a 490 nm em espectrofotômetro[13].

IDGA

Foi utilizada a técnica de IDGA[14] descrita por Abreu *et al*., (1998), realizada em agarose a 1%, utilizando 20 µl do soro teste e 20 µl do soro controle positivo, e 20 µl do antígeno na cavidade central. Após, foram acondicionadas em câmara úmida, a temperatura ambiente (25 ºC) por 48 horas. As reações eram avaliadas pela presença de linha de precipitação, obtida entre o antígeno e o soro controle positivo.

Soro

O soro foi obtido de amostras de sangue coagulado centrifugado e estocado a –20 ºC. Foram utilizadas 16 amostras de soros provenientes de rebanho com resultados sorológicos negativo foram usados para determinar o cut-off do ELISA (média das PP do negativo mais três desvios padrões do PP) e 175 soros foram testados para comparação.

Analise Estatística

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos no ELISA indireto, tomando-se como padrão o teste de IDGA utilizando antígeno comercial. Foram avaliados as sensibilidade comparada, especificidade comparada, valor preditivo positivo e negativo e precisão (Madruga *et al*.., 2001). Os resultados dos teste foram comparados através do teste do Qui-Quadrado com correção de Yates (χ^2) (Tyler e Cullor, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos dois testes.

Resultados

Na padronização do teste obteve-se um protocolo capaz de ter um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) com boa resolução, resultando em reações de baixo background. O ELISA foi padronizado para obter a maior diferença entre a DO dos soros positivos e negativos. A concentração ótima do antígeno foi 2 µg/ml, e a diluição do soro foi 1:100. Os 16 soros provenientes de rebanhos negativos foram retestados para O IDGA e apresentaram resultados negativos. O cut-off do ELISA foi 0,898. De acordo, com este critério, o ELISA detectou maior número de positivos que o IDGA (40). A comparação entre os dois testes nas 175 amostras está demonstrado nas Tabelas 1 e 2. Das 11 amostras positivas

---

[11] Placa flexível de 96 well de vinyl Costar ® cat nº2545
[12] OPD sigma P-6787
[13] Espectrofotômetro Metertech Σ960
[14] Os kits contendo o antígeno, soro padrão positivo e o ágar, utlizados no teste diagnóstico, foram adquiridos do Laboratório de Biotecnologia para Saúde Animal (Biovetech)- Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

no IDGA , uma foi negativa no ELISA enquanto que 30 amostras negativas no IDGA positivaram no ELISA. A sensibilidade foi de 91%, especificidade 82%, Valor preditivo positivo 25%, Valor preditivo negativo:99% com precisão de 88% e um índice Kappa de 0,32.Os dados foram significativos para o Qui-Quadrado (p<0,001).

Tabela 1.

Comparação dos resultados com soro ovino testados pelo IDGA e ELISA

	IDGA		
ELISA	Positivo (PP>0,898)	Negativo (PP≤ 0,898)	Total
Positivo	10	30	41
Negativo	1	134	134
Total	11	164	175

sensibilidade:91%, especificidade:82% Qui-Quadrado entre os testes:26,85 (p<0,001)

Tabela 2.

Resultados de 175 amostras de soro ovino pelos testes IDGA e ELISA para o diagnóstico sorológico de MVV

	Pos	%	Neg	%	Total
IDGA	11	6,3	164	93,7	175
ELISA*	41	23,4	134	76,6	175

*Pos(PP > 0,898 em relação ao padrão positivo)

Neg (PP < 0,898 em relação ao padrão positivo)

Discussão

Foi utilizado como controle positivo o soro padrão positivo anti-MVV p-28 do kit de IDGA do Instituto Pourquier, e este apresentou leituras positivas o que não foi observado por Pinheiro (2001) que usando o soro

reagente do kit americano[15] encontrou um valor negativo, o que se justificou pelo fato deste soro ser contra gp135, e o antígeno ser pobre em gp 135, já no caso deste ELISA pode-se inferir que houve positividade devido o soro ser contra p28 e o antígeno com vírus completo possuir uma concentração de p28 capaz de detectar positividade. Celer Jr. *et al*., (1998) verificaram, por immunoblotting que a gp 135 foi evidente em soros extremamentes positivos e, portanto, não a utilizaram para confirmação de diagnóstico. As glicoproteínas são relativamente instáveis e passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção do antígeno (Rimstad *et al*., 1994), principalmente na passagem pelo colchão de sacarose, onde pode ocorrer perdas de até 50% destas proteínas virais (McGrath *et al*.,1978), ou até mesmo perdas espontâneas das partículas virais liberadas depois de vários dias de cultivo (Castro, 1998).

Para comparação de técnicas, o ideal é se dispor de um teste de referência, segundo Knowles (1997) pode ser adotado imunoprecipitação e Western blotting, como critério independente e seguro de classificação da população em verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Pelas particularidades da patogênese dos LVPR, a determinação do verdadeiro status dos animais é difícil pois a restrição da replicação viral torna o isolamento incerto (Castro,1998). Por isso, foi adotado o critério de cálculo da sensibilidade e da especificidade com base nos resultados dos próprios testes sorológicos, o que pode penalizar certos testes.

O IDGA foi escolhido como teste padrão para o diagnóstico de MVV por ser o teste recomendado pelo OIE para o exame diagnóstico e para comercialização de pequemos ruminantes (OIE,1996).

Os resultados mostraram maior sensibilidade que a IDGA. Comparando este protocolo de ELISA com relação à IDGA verificou-se que detectou 23,6% mais animais positivos, enquanto Pinheiro (2001), Castro (1998), Simard e Briscoe (1990) e Celer Jr *et al*., (1998) comparando os mesmos teste verificaram 44,5%, 25,4%, 15,5% e 15,5%, respectivamente. Entretanto, utilizando o ELISA com sistema de amplificação do sinal enzimático pelo sistema de amplificação do sinal enzimático pelo sistema avidina-biotina, Castro (1998) detectou cerca de 84% a mais que o teste IDGA, porém com o aumento do custo e do tempo do teste. Deve-se considerar, além de fatores inerentes aos testes, que existam animais que apresentem resposta imunológica seletiva para determinados antígenos (Johnson *et al*., 1983;Rimstad *et al*., 1994). O antígeno utilizado na IDGA não recebeu tratamento, sendo constituído predominantemente de glicoproteínas (Adams e Gorham, 1986). A relativa instabilidade das glicoproteínas, passíveis de serem perdidas durante o processo de obtenção de antígenos a partir do vírus completo (Rimstad *et al*., 1994), bem como o processamento do ELISA,

[15] Caprine Arthritis-Encephalitis/ovine progressive Pneumonia Antibody test kit veterinary diagnostic Technology, INC®, USA

principalmente as lavagens com PBS contendo Tween 20, podem ter exposto certos epítopos, para os quais certos animais elaboraram resposta imunológica de intensidade indetectável pelo IDGA ou ELISA.

A especificidade de 82% do ELISA decorreu, provavelmente, da forma imperfeita de classificação dos verdadeiros negativos, pois o grupo de animais empregados na determinação do ponto de corte, eram negativos apenas pelo IDGA que pode apresentar resultados falsos negativos ou detectar a doença somente depois de alguns meses (Castro,1998).

Chebloune *et al*., (1996) relatam um número significativo de animais infectados com sorologia negativa (falsos negativos), mas deve ser considerado que a resposta imune contra LVPR apresenta variações individuais (Rimstad *et al*.,1994). Em consequência de uma maior sensibilidade o ELISA desenvolvido mostrou-se um teste mais viável que a IDGA para utilização no controle desta infecção.

Conclusão

O ELISA produzido apresentou alta sensibilidade e uma boa especificidade podendo ser utilizada como teste diagnóstico para MVV nos ovinos do Ceará- Brasil. Detectando um maior número de animais positivos que o IDGA. O protocolo do ELISA desenvolvido utiliza baixa quantidade de reagentes e realiza exames de 42 amostras por placa. Assim quando comparado com o IDGA, este foi superior em relação a sensibilidade.

Agradecimentos

A EMBRAPA-CNPC por fornecimento de material e por ceder seu laboratório de Patologia Clínica para realização de parte do trabalho. A Fundação Cearense de apoio ao desenvolvimento Científico e tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro em forma de bolsa a mestranda Tânia V. M. Dantas durante todo o experimento.

Bibliografia

Abreu, S. R. O., Castro, R. S., Nascimento, S. A., (1998). Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus maedi-visna para imunodifusão em ágar-gel. *Pesq. Vet. Bras***.** 18:57-60.

Adams, D.S. e Gorham, J.R., (1986). The gp 135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p 28 in immunodiffusion serology. *Res. vet. Sc.i*. 40:157-160.

Almeida, A. M. R. e Lima, J. A. A., (2001). *Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia*. Publicação SBF, Brasília/Fortaleza, 186 p.

Bradford, M. M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitration of microgram quanties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. biochemistry*. 72: 248-54.

Castro, R. S., (1998). *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, Perfil sorológico e inferências filogenéticas.* Belo Horizonte. MG: UFMG – Escola de Veterinária. 132p. Tese (Doutorado)

Celer Jr, V., Celer, V., Némcová, H., Zanoni, R. G., Peterhans, E., (1998). Serologic Diagnosis of ovine lentivirus by whole vírus ELISA and AGID test. *J. of Vet. M. B.* 45: 183-188.

Cutlip, R. C., Jackson, T. A., Laird, G. A. ,(1977). Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *American J. Vet. Res.*. 38: 1081-1084.

De la Concha – Bermejillo, A., Brodie, S. J., Magnus – Corral, S., Bowen, R. A., DeMartini, J. C.,(1995). Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypicalty distinct lentiviruses . *J. Acquir. immune defice. syndr. human retrovirol*. 8: 116-123, 1995.

Fevereiro, M.; Barros, S.; Fagulha, T. ,(1999). Development of a monoclonal antibody blocking – ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. *J. of Virological methods*. 81: 101-108.

Houwers, D.J., Gielkens, A.L.J., Schaake Junior, J. (1982). An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to Maedi-Visna virus. *Vet. Microbiol.*, 7:209-219.

Johnson, G.C., Barbet, A F., Klevjer-Anderson, P., Mcguire, T.C. (1983). Preferential immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. *Infectivi. Immunol.*. 2 41:657-665.

Knowles, D. P., (1997). Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin North. Am.: Food Animal. Pract*. 13: 1-11.

McGrath, M., White, O, Pincus, T., Weissman, I.L. (1978). Retrovirus purification: Method that conserves envelop glycoprotein and maximizes infectivity. *J. Virology*. 25:923-927.

Motha, M.X. e Ralston, J.C., (1994). Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Veter. Microbiol.*.38:359-367.

Narayan, O. e Clements, J. E., (1989). Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. of Gen.l Virological.* 70: 1617-1639.

Narayan, O., Clements, J. E., Stranberg, J. D., Cork, L. C.; Griffin, D. E., (1980). Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Genetic Virology.* 50: 69-79.

Office International des Epizooties., (1996). *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. World Organization for Animal health, 369-373.

Pinheiro, R. R., (2001). *Vírus de Artrite Encefalite Caprino: Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará.* Belo Horizonte: UFMG, 115p. Tese (Doutorado).

Reis , J.K.P. e Leite, R.C., (1994). An enzyme-linked immunossorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anaemia in Brazil. *Prev. Veter. Medicine*. 20:261-267.

Rimstad, E., East, N., DeRock,E., Higgins, J., Pedersen, N., (1994). Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*. 134:345-356.

Simard, C. L. e Briscoe, M. R., (1990). An enzyme – linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparasion to conventional agar gel immunodifusion test. *Can. of J. Vet. Res.*, 54: 451-456.

Soares, C.O., (2001). Princípios , padronização e validação de provas sorológicas. In: *Imunodiagnóstico em medicina Veterinária*. Editores :Madruga, C.R., Araújo, F.R., Soares, C.O., EMBRAPA gado de corte (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), 145-175.

Torfason, E.G., Gudnadottor, M., Love, A, (1992). Comparison of immunoblots with neutralizing and complement fixing antibodies in experimental and natural cases of visna-Maedi. *Archives of Virol.*, 123:47-58.

Tyler, J.W. e Cullor, J.S., (1989). Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J. American Vet. Medic. Assoc.* 194:1550-1558.

Vasconcelos, V. R.; Vieira, L. S. (2003). *A evolução da caprino-ovinocultura brasileira* [online]. Disponível em: www.cnpc.embrapa.br/artigos. Acessado em 30/08/2003

Vitu, C., Russo, P., Vigne, R., Querat, G., Giauffret, A., (1982). An ELISA Test For Detection Of Maedi- Visna antibodies. Comparative study with Gel Immunodiffusion na complement fixation test. *Comparative Immunol. and Microb. Infect. Disease.* 45: 469-481.

Wright, P.F., Nilsson, E., Vanrooij, E.M.A., Lelenta, M., Jeggo, M.H. (1993). Standardization and validation of enzyme-linked immnuosorbent assay techniques for yhe detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Revue Scientifique de I´Office International des Epizooties*.12:435-450.