

Imunodiagnóstico para a artrite-encefalite caprina em rebanhos do semiárido baiano, Brasil*

Carla Caroline Valença de Lima¹⁺, Joselito Nunes Costa², Thiago Sampaio de Souza¹, Priscila Martinez Martinez³, Antônio Oliveira Costa Neto⁴, Dalva Alana Aragão Azevedo⁵ e Raymundo Rizaldo Pinheiro⁶

ABSTRACT. Lima C.C.V., Costa J.N., Souza T.S., Martinez P.M., Costa Neto A.O., Azevedo D.A.A. & Pinheiro R.R. [**Immunodiagnostic for arthrititis encephalitis caprine in flocks of semi-arid region in Bahia state, Brazil.**] Imunodiagnóstico para a artrite-encefalite caprina em rebanhos do semiárido baiano, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 00(0):00-00, 1900. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Salvador, BA 40170-110, Brasil. E-mail: carlacvlima@gmail.com

This work had the purpose of standardizing the technique of indirect immunosorbent assay (i-ELISA) for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis (CAE) in flocks of Microregion of Juazeiro, and to compare the results obtained with other techniques. To attain our goal, we evaluated 693 blood serum samples of goats from 46 farms in this Microregion (Campo Alegre de Lourdes, Casa Nova, Curaçá, Juazeiro, Pilão Arcado, Remanso, Sento Sé and Sobradinho). About the seroprevalence obtained in i-Elisa, 1.59% (11/693) of the animals showed they possess the anticorps against the CAE's virus and 15.22% (7/46) of the properties had seropositive animal. Results of commercial AGID demonstrated that only 0.29% (2/693) of the samples were positive. Standard ELISA showed 100% sensitivity and 98.7% specificity, with kappa of 0.30 compared to the commercial AGID. Of the 693 samples, 65 were used in techniques of Immunoblotting (IB) and different AGID kits. There was no difference in the results obtained in the AGID kits, and IB demonstrated higher sensitivity than i-ELISA. Therefore, it is recommended to use different techniques such as AGID and Elisa in order to improve the diagnosis of CAE control programs.

KEY WORDS. Serology, immunoassay, SRLV, CAEV.

*Recebido em ...

Aceito para publicação em...

¹ Médico-veterinário. Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Salvador, BA 40170-110, Brasil. E-mail: thiago_sampaio@hotmail.com; *Autora para correspondência, E-mail: carlacvlima@gmail.com

² Médico-veterinário, DSc, Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, 500, Salvador, BA 40170-110. E-mail: joselitonc@yahoo.com.br

³ Médica-veterinária, MSc, Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba (Codevasf), Av. Comissão do Vale do São Francisco, s/n, Bairro Piranga, Juazeiro, BA 48901-900, Brasil. E-mail: martinezpriscila@ig.com.br

⁴ Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Avenida Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, Feira de Santana, BA 44036-900, Brasil. E-mail: aocneto@hotmail.com

⁵ Graduanda, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Estadual do Vale do Acaraú, Avenida da Universidade, 850, Sobral, CE 62040-370, Brasil. E-mail: bio_lana@hotmail.com

⁶ Médico-veterinário, Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral, Km 4, Jordão, Sobral, CE 62010-970, Brasil. rizaldo@cnpc.embrapa.br

RESUMO. Este trabalho teve como finalidade padronizar a técnica de ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-i) para diagnóstico da artrite-encefalite caprina (CAE) em rebanhos da Microrregião de Juazeiro, bem como comparar os resultados obtidos com outras técnicas imunodiagnósticas. Para tal, foram avaliadas 693 amostras de soros sanguíneos de caprinos, de 46 propriedades rurais da Microrregião (Campo Alegre de Lourdes, Casa Nova, Curaçá, Juazeiro, Pilão Arcado, Remanso, Sento Sé e Sobradinho). Quanto à soroprevalência obtida no Elisa-i, 1,59% (11/693) dos animais apresentaram anticorpos contra o vírus da CAE e 15,22% (7/46) das propriedades possuíram animal soropositivo. Quando na realização do IDGA comercial, apenas 0,29% (2/693) das amostras foram positivas. O Elisa padronizado demonstrou 100% de sensibilidade e 98,7% de especificidade, com índice kappa igual a 0,30 se comparado ao IDGA comercial. Das 693 amostras, 65 foram testadas pela técnica de Immunoblotting (IB) e por diferentes kits de IDGA. Não houve diferença nos resultados obtidos nos kits de IDGA, e o IB demonstrou maior sensibilidade que o Elisa-i. Portanto, é recomendada a utilização de diferentes técnicas, como o IDGA e o Elisa, a fim de se complementar o diagnóstico da CAE em programas de controle.

PALAVRAS-CHAVE. Sorologia, imunodiagnóstico, LVPR, CAEV, caprinocultura.

INTRODUÇÃO

O estado da Bahia possui destaque na caprinocultura nacional, detendo o maior rebanho caprino do país, sendo que 30,9% deste efetivo encontram-se na Microrregião de Juazeiro, representando 10,4% do rebanho nacional (IBGE 2008). Dentre as enfermidades infecciosas que acometem estes animais, uma que merece atenção é a lentivirose caprina (LVC), também conhecida como artrite-encefalite caprina (CAE). Esta enfermidade é causada por um vírus da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, grupo lentivírus de pequenos ruminantes, que apresenta período de incubação longo, evolução geralmente crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte, gerando grandes prejuízos aos rebanhos caprinos. Não existe tratamento ou vacina, sendo o diagnóstico a única forma de prevenção (Pinheiro et al. 2001, Martinez et al. 2011).

Diversos estudos epidemiológicos no Brasil têm demonstrado a disseminação das lentivirose de pequenos ruminantes em vários estados, sendo que um dos fatores que tem contribuído para isso é a prática de melhoramento genético utilizando-se raças importadas, sem os devidos cuidados necessários para evitar a introdução de agentes infecciosos (Almeida et al. 2001, Almeida et al. 2003, Pinheiro et al. 2004, Martinez et al. 2010).

Por muitas vezes não haver manifestação clínica, é prática rotineira a utilização de diagnóstico laboratorial, principalmente as técnicas sorológicas. Os testes sorológicos mais utilizados para identificação de animais infectados com o LVC são a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (Elisa) (Reischak et al. 2002), sendo que no país só é comercializado o kit para imunodifusão em gel de ágar (IDGA), com antígeno a base da proteína estrutural p28 (Biovetech®).

Considerando a grande importância da caprinocultura para o estado da Bahia, e a necessidade de aprimoramento do diagnóstico das LVPR, este trabalho teve como finalidade padronizar uma nova técnica de Elisa indireto, e a partir desta, determinar a

prevalência da LVC na Microrregião de Juazeiro, comparando os resultados obtidos com o uso das técnicas de Imunoblotting (IB) e diferentes kits de IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de antígenos, foram utilizados cultivos secundários de células de membrana sinovial caprina (MSC) (Abreu et al. 1998). Após o estabelecimento do cultivo de MSC em garrafas roller, monocamadas semiconfluentes (70 a 90% de confluência) foram inoculadas com a amostra padrão CAEV-Cork, conforme técnica descrita por Pinheiro et al. (2006a).

Nos ensaios de IB e Elisa-i, o antígeno foi preparado utilizando-se o método de ultracentrifugação em colchão de sacarose (UCCS) (Dantas et al. 2008). A concentração da proteína total foi determinada pelo método de Bradford (1976) e o antígeno mantido a -80°C até a realização dos ensaios laboratoriais.

Na padronização do ELISA-i, utilizou-se a metodologia descrita por Pinheiro et al. (2006a), empregando-se microplacas flexíveis com 96 poços (Costar®), de alta capacidade de adsorção. Avaliações com diferentes diluições de antígeno, soro e conjugado (anti-IgG caprino marcado com peroxidase-SIGMA®) foram conduzidas de forma a estabelecer as melhores concentrações capazes de expressar reações positivas, considerando uma ampla diferença entre soros padrões positivo e negativo. Uma vez estabelecidas às diluições, os testes foram conduzidos utilizando-se o soro padrão positivo em quadruplicata e o soro padrão negativo, bem como os soros testes, em duplicata. Os resultados expressos em densidade óptica (DO) foram transformados em percentual de positividade (pp), a partir do resultado médio do soro padrão positivo, variando de 0 a 100%. O ponto de corte (pp + 3 desvios padrões) foi estabelecido a partir da média dos valores obtidos de 92 caprinos de rebanhos negativos por IDGA e WB, estabelecendo o valor de 39,8 como limite de DO para amostra negativa.

A sensibilização das placas foi realizada com 0,125µg de antígeno/poço em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6) acompanhada de incubação por uma hora a 37°C e overnight sob refrigeração. Após a incubação, lavou-se duas vezes com solução de lavagem (solução salina 0,9%; 0,05% de Tween 20). Bloquearam-se os sítios livres com solução de bloqueio (PBS com 2% de caseína) a 37°C por 90 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas duas vezes. Foram distribuídos 100µL/poço de soros testes, soro padrão positivo e soro padrão negativo, diluídos 1:150 em tampão de incubação (PBS com 0,25% de caseína; 0,05% de Tween 20), onde permaneceram por 60 minutos a 37°C. Após seis lavagens, distribuiu-se 100µL/poço do conjugado na diluição 1:3000 em tampão de incubação, mantendo-se por 60 minutos a 37°C. As placas foram lavadas por seis vezes e reveladas pela adição de 100µL/poço de substrato, constituído por solução de 0,2mg de σ -phenylenediamine (OPD) e 0,02% (v/v) de H₂O₂ em tampão citrato-fosfato (0,1M; pH 5,0), por 15 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As reações foram paradas com 20µL de H₂SO₄ na diluição 1:20. A intensidade da cor da reação foi determinada por absorbância em leitor de microplacas de ELISA, com 492nm de comprimento de onda. Todas as etapas, com exceção da revelação, foram realizadas sob agitação.

Para os testes de IDGA, foram utilizados três diferentes kits: o comercial produzido pela Biovetech (IDGAc), o americano (*Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit*), produzido pela *Veterinary Diagnostic Technology, Inc® - USA* (IDGAa), e o da Embrapa Caprinos e Ovinos (IDGAe). A técnica se baseia na formação da linha de precipitação decorrente da ligação antígeno-anticorpo, e o soro teste é considerado positivo quando há formação de linha de identidade com o soro padrão.

Os testes de IDGAc e IDGAa foram realizados seguindo as recomendações dos respectivos fabricantes, sendo que o primeiro utiliza antígeno contendo principalmente a proteína do capsídeo (p28) (Abreu et al. 1998), já o segundo possui também no seu antígeno a proteína transmembrânica gp135.

O antígeno utilizado no IDGAe possui p28 e foi obtido através de ultrafiltração (sistema AMICON®), alcançando uma concentração de 50 vezes do volume inicial (Pinheiro et al. 2010). O teste foi conduzido em lâminas contendo gel de agarose a 0,9% em tampão fosfato (Pinheiro et al. 2006a).

No teste de IB, seguiu-se o protocolo de Aragão et al. (2008) modificado. Após a realização da eletroforese, as proteínas do antígeno foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (MN) passivamente (Tesoro-Cruz et al. 2009). Em seguida, as mesmas foram bloqueadas e deu-se sequência a técnica. As concentrações de soro e conjugado foram de, respectivamente, 1:50 e 1:15000.

Consideraram-se como positivos os soros cujas tiras apresentaram reação para o polipeptídeo com peso molecular próximo a 28Kda, tendo-se como parâmetro a tira do soro controle positivo e o padrão de peso molecular de proteínas (Oliveira et al. 2008).

Quanto ao número de amostras testadas, para as técnicas de Elisa-i e IDBAC, foram utilizados 693 soros de caprinos oriundos de 46 rebanhos pertencentes à Microrregião de Juazeiro - Bahia, que está dividida em oito municípios: Pilão Arcado, Campo Alegre de Lourdes, Remanso, Sento Sé, Casa Nova, Sobradinho, Juazeiro e Curaçá. O tamanho aproximado da amostra foi calculado segundo Thrusfield (2004), com nível de confiança de 99% e erro amostral de 5%.

Com base nos resultados sorológicos obtidos no Elisa-i e no IDGAc, foram calculados a especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo, concordância e índice kappa (k). A sensibilidade e especificidade relativas foram submetidas ao teste de qui-quadrado (χ^2) corrigido por Yates e pelo teste exato de Fischer (Thrusfield 2004).

A fim de uma comparação mais minuciosa, 65 amostras, selecionadas entre os rebanhos que apresentaram positividade a algum dos dois testes (Elisa-i e/ou IDGAc), foram submetidas aos testes de IDGAa, IDGAe e IB com antígeno produzido na Embrapa, isto porque se tratam de ensaios mais onerosos.

RESULTADOS

A produção do antígeno viral ultracentrifugado em colchão de sacarose resultou em um volume final de 7,4mL, sendo que a dosagem de proteína foi de 3,18mg/mL. Na eletroforese de produtos obtidos na ultracentrifugação do antígeno (colchão de sacarose, pré-antígeno e antígeno), foram verificadas bandas com diferentes pesos moleculares (Figura1A). No IB desses produtos, foram identificadas diversas bandas imunogênicas, tendo maior destaque a de aproximadamente 28kDa, inclusive na fração correspondente ao colchão de sacarose (Figura1B).

Quanto a soropositividade, foram testadas 693 amostras de soro de caprinos pertencentes a 46 propriedades situadas em oito municípios da Microrregião de Juazeiro-BA, utilizando-se as técnicas de Elisa-i e IDGAc. No Elisa-i 1,59% (11/693) dos animais apresentaram positividade (Tabela 1), e 15,22% (7/46) das propriedades possuíam animais soropositivos (Tabela 2). No IDGAc apenas 0,29% (2/693) dos animais foram positivos, com 2,17% (1/46) das propriedades contendo animais soropositivos.

Quanto à comparação dos resultados obtidos para os testes de Elisa-i e IDGAc, os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), concordância e índice kappa estão descritos na Tabela 3.

Objetivando realizar uma análise mais minuciosa dos resultados obtidos, foram selecionadas 65 amostras dentre as 693, utilizando-se como critérios de escolha: positividade em alguma das técnicas (Elisa-i e/ou IDGAc); serem provenientes de rebanho contendo animal soropositivo; apresentarem densidade óptica próxima ao ponto de corte estabelecido para o Elisa-i. Os resultados obtidos no IB estão descritos na Tabela 4.

Quanto aos testes de IDGA, os três kits apresentaram as mesmas amostras soropositivas, estabelecendo uma concordância de 100% para as 65 amostras testadas. Quando comparados ao método de IB, apresentaram alta especificidade e baixa sensibilidade, conforme descrito na Tabela 5.

DISCUSSÃO

Ao observar as características das bandas imunogênicas obtidas no antígeno, não observou-se a gp135, possivelmente devido a sensibilidade desta aos tratamentos utilizados na purificação do antígeno, não sendo observada nas análises utilizando o antígeno UCCS (Aragão et al. 2008).

Os resultados para soroprevalência obtidos pelas técnicas de Elisa-i e IDGAc apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,01$). Entretanto, são considerados baixos quando comparados com outros estudos realizados no Ceará (Melo & Franke 1997), São Paulo (Madureira & Gomes 2007) e Goiás (Santin et al. 2002). Isto pode ser justificado pelas características de produção observadas na Microrregião de Juazeiro, com predominância de sistemas extensivos de criação, principalmente para exploração de corte, com padrão racial nativo e/ou mestiço e pouca tecnificação, conforme já relatado por Souza et al. (2010) e Martinez et al. (2011). Segundo Pinheiro et al. (2001) e Sobrinho et al. (2010), a ocorrência de elevada soropositividade está associada a rebanhos leiteiros criados intensivamente.

Os valores de sensibilidade e especificidade observados para o Elisa-i estão de acordo com outros protocolos utilizados (Lara et al. 2002, Cruz et al. 2009, Torres et al. 2009), onde o Elisa tem demonstrado maior capacidade de identificar animais soropositivos frente ao IDGA. Cruz et al. (2009) afirmam que o Elisa-i possui a capacidade de verificar animais com níveis de anticorpos inferior aos detectáveis por IDGA.

Torres et al. (2009) afirmam que a maior sensibilidade do Elisa se deve ao fato de nesta técnica ser necessária apenas uma interação de um anticorpo por epítipo, para se obter um resultado positivo, enquanto no IDGA são necessárias várias ligações anticorpo-epítipo para ser considerado positivo.

No IB foi possível verificar duas bandas imunogênicas dominantes, a de 28 e a de 14kDa, proteína de capsídeo e de matriz respectivamente, ambas codificadas pelo gene gag (Tesoro-Cruz et al. 2003). Estas bandas já foram evidenciadas em outros estudos (Pinheiro 2001, Aragão et al. 2008). Entretanto, Oliveira et al. (2008), estudando o lentivírus ovino, evidenciaram soropositividade dominante relacionada mais intensamente com as proteínas de peso 70, 50, 40 e 25kDa. Isto se deve possivelmente à diferente técnica de obtenção do antígeno.

Segundo Dantas et al. (2008), para a comparação de técnicas, o ideal é dispor de um teste de referência. Neste trabalho optou-se por adotar o IB como critério para classificar a população de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos, seguindo indicações de Knowles et al. (1997), que recomendam a utilização da imunoprecipitação ou do imunoblotting como um critério seguro. Entretanto, Castro et al. (1999) ressaltam ser dificultosa a determinação do verdadeiro status do animal, por se tratar de uma doença com progressão lenta e soroconversão muitas vezes tardia (6 a 12 meses após a infecção).

Heckert et al. (1992) ao comparar o Elisa-i padronizado com os testes de IDGA, IB e IFI, considerando como referencial positivo e negativo a resposta a pelo menos dois dos três testes, obtiveram valores de sensibilidade e especificidade de 98,3% e 97,9% respectivamente além de obter um índice kappa de 0,7 em comparação às outras técnicas. Esses resultados foram superiores aos observados neste estudo, entretanto, concordam com a boa sensibilidade do Elisa. Outros estudos já afirmaram o bom desempenho do Elisa quando comparado a IFI (Lara et al. 2002), ao IB (Tesoro-Cruz et al. 2003) e ao PCR (Andres et al. 2005).

Segundo Knowles et al. (1994), a comparação da técnica de IB com os diferentes kits de IDGA apresentou um nível moderado de concordância ($k=0,5$). Quanto à menor sensibilidade da técnica de IDGA se comparado ao IB, isso pode ser devido às características do antígeno utilizado, uma vez que o antígeno UCCS utilizado no IB é muito mais específico e purificado se comparado ao ultrafiltrado (Pinheiro et al. 2006).

Reischack et al. (2002) afirmaram que a sensibilidade dos testes de IDGA está diretamente relacionada à composição dos antígenos, pois alguns animais apresentam anticorpos para gp135 na ausência de resposta detectável para p28 e vice-versa. Knowles et al. (1994) demonstraram que cabras infectadas com o LVC apresentam títulos muito maiores para gp135 se comparado a p28. Entretanto, neste trabalho, não houve diferença entre os resultados utilizando somente a p28 (IDGAe e IDGAc) ou ambas as proteínas (IDGAa).

Uma vez comparados os resultados obtidos nas diferentes técnicas sorológicas, demonstra-se que a técnica de IDGA pode ser implementada nos estudos de triagem de rebanhos, principalmente quando não há dados de ocorrência da enfermidade. Entretanto, para um melhor acompanhamento do status sanitário do rebanho, recomenda-se a complementação do diagnóstico com técnicas mais sensíveis, como o Elisa e o Immunoblotting, principalmente por ser o IDGA uma técnica que subestima a ocorrência da enfermidade quando em animais recentemente infectados ou com soroconversão tardia (Modolo et al. 2009).

Aragão et al. (2008) ressaltam que dentre as características que alteram a eficiência dos programas sanitários, estão a sensibilidade e a especificidade dos testes utilizados no diagnóstico inicial e a frequência de sua utilização, salientando que testes sorológicos com maior sensibilidade devem ser utilizados quando ocorrer redução substancial da quantidade de animais soropositivos, testados por IDGA. Reischak et al. (2002) sugeriram a utilização de técnicas como a Imunofluorescência indireta (IFI), o IB e o PCR na detecção de animais clinicamente normais e sorologicamente negativos em testes como o IDGA.

CONCLUSÕES

Portanto, conclui-se que a técnica padronizada de Elisa-i demonstrou bons resultados se comparada ao IDGA, apresentando maior sensibilidade, e portanto é aconselhável para ser implementado em programas de controle da enfermidade.

Agradecimentos. Aos criadores de caprinos da Microrregião de Juazeiro; à Embrapa Caprinos e Ovinos pelo antígeno disponibilizado e pela estrutura laboratorial utilizada para a realização dos exames; à Fundação de Amparo a Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB) pelo financiamento do projeto, ao Centro de Desenvolvimento da Pecuária (CDP) e à Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba (CODEVASF 6ªSR) pelo apoio técnico às ações realizadas a campo, a CAPES pela bolsa de estudos concedida.

REFERÊNCIAS

- Abreu S.R.O., Castro R.S., Nascimento S.A. & Souza M.G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 18:57-60, 1998.
- Almeida M.G.A.R., Anunciação A.V.M., Figueiredo A., Martinez T.C.N. & Labordas S.S. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite-encefalite caprina (CAE) no Estado da Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 1:78-83, 2001.
- Almeida N.C., Teixeira M.F.S., Ferreira R.C.S., Callado A.K.C., Frota M.N.L., Melo A.C.M. & Aprigio C.J.L. Detecção de ovinos soropositivos para Maedi-Visna destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. *Veterinária Notícias*, 9:59-63, 2003.
- Andres D., Klein D., Watt N.J., Berriatua E., Torsteinsdottir S., Blacklaws B.A. & Harkiss G.D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, 107:49-62, 2005.
- Aragão M.A.C., Pinheiro R.R., Andrioli A., Alves F.S.F., Oliveira A.A.F. & Teixeira M.F.S. Maedi-Visna Vírus: produção de antígeno, análise protéica e antigênica. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75:423-429, 2008.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254, 1976.
- Castro R.S., Greenland T., Leite R.C., Gouveia A., Mornex J.F. & Cordier G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *Journal of General Virology*, 80:1583-1589, 1999.
- Cruz R.B., Putini V.B., Santana G.S., Jorge J.S., Coelho I., Silva D.L., Zacharias F., Tigre D. & Cerqueira R.B. Estudo comparativo da sensibilidade e da especificidade de Elisa indireto com o teste de imunodifusão em gel de agarose no diagnóstico sorológico da artrite-encefalite caprina (CAE). *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais*, 7:355-364, 2009.
- Dantas T.V.M., Araújo S.A.C., Pinheiro R.R., Aragão M.A.C., Silva J.B.A., Ricarte A.R.F., Ribeiro A.L. & Teixeira M.F.S. Desenvolvimento e padronização de um Elisa indireto para diagnóstico de maedi visna em ovinos. *Ciência Animal Brasileira*, 9:181-187, 2008.
- Heckert R.A., McNab W.B., Richardson S.M. & Briscoe M.R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *Canadian Journal Veterinary Research*, 56:237-241, 1992.
- Knowles D.P., Evermann J.F., Shropshire C., Vanderschalie J., Bradway D., Gezon H.M. & Cheevers W.P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis encephalitis virus. *Journal of clinical microbiology*, 32:243-245, 1994.
- Knowles Jr. D.P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinical North American: Food Animal Practice*, 13:1-11, 1997.
- Lara M.C.C.S.H., Birgel Jr E.H., Reischak D., Moojen V., Gregory L., Oliveira J.C.F. & Birgel E.H. Identificação imunossorológica de anticorpos antivírus da artrite-encefalite caprina: comparação das técnicas de imunodifusão em gel de Agar, ensaio imunoenzimático e imunofluorescência indireta. *Arquivos do Instituto Biológico*, 69:1-5, 2002.

- Madureira K.M. & Gomes V. Prevalência da Artrite Encefalite Caprina (CAE) em propriedades leiteiras do Estado de São Paulo. *Revista de Ciências Veterinárias*, 5:86-90, 2007.
- Martinez P.M., Costa J.N., Souza T.S., Costa Neto A.O. & Pinheiro R.R. Sistemas de criação de ovinos e ocorrência de anticorpos contra o vírus da Maedi-Visna na Microrregião de Juazeiro - Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 11:342-353, 2010.
- Martinez P.M., Costa J.N., Souza T.S., Lima C.C.V., Costa Neto A.O. & Pinheiro R.R. Prevalência sorológica da maedi-visna em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro - Bahia por meio do teste de imunodifusão em gel de ágar. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, 12:322-329, 2011.
- Melo A.C.M. & Franke C.R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da Grande Fortaleza, Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, 27:113-7, 1997.
- Modolo J.R., Stachissini A.V.M., Padovani C.R., Araújo Júnior J.P., Castro R.S., Ravazzolo A.P. & Leite B.L.S. PCR associate d with agar gel immunodiffusion assay improve caprine arthritis-encephalitis (CAEV) control. *Small Ruminant Research*, 81:18-20, 2009.
- Oliveira M.M.M., Melo M.A., Andrade P.P., Gomes S.M., Campos A.C., Nascimento S.A. & Castro R.S. Western Blot para o diagnóstico das infecções pelos lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos: um método simples para a produção de antígeno. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75:263-270, 2008.
- Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G. & Alves F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina no Estado do Ceará, Brasil. *Ciência Rural*, 31:449-454, 2001.
- Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G., Alves F.S.F. & Andrioli A. Perfil de propriedades no estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. *Ciência Animal*, 14:29-37, 2004.
- Pinheiro R.R., Olortegui C.D.C., Gouveia A.M.G., Araújo S.C. & Andrioli A. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 101:557-558, 2006a.
- Pinheiro R.R., Gouveia A.M.G., Torres A.M.C., Andrioli A. & Alves F.S.F. Custos dos antígenos e dos testes para diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 28:110-113, 2006.
- Pinheiro R.R., Andrioli A., Gouveia A.M.G., Aragão M.A.C. & Martinez P.M. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77:133-137, 2010.
- Reischak D., Ravazzolo A.P. & Moojen V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 22:7-12, 2002.
- Santin A.P.I., Brito W.M.E., Reischak D. & Brito L.A.B. Artrite encefalite caprina: identificação de animais soropositivos no estado de Goiás. *Ciência animal brasileira*, 3:67-71, 2002.
- Sobrinho P.A.M., Ramos T.R.R., Fernandes C.H.C., Campos A.C., Costa L.M. & Castro R.S. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. *Ciência Animal Brasileira*, 11:117-124, 2010.
- Souza T.S., Costa J.N., Martinez P.M., Costa Neto A.O. & Pinheiro R.R. Anticorpos contra o vírus da língua azul em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro, Bahia. *Arquivos do Instituto Biológico*, 77:419-427, 2010.

- Tesoro-Cruz E., Gonzalez R.H., Rodriguez A.M., Álvarez H.R., Ortega M.E.T., Schmid R.K. & Setién A.A. Detección de anticuerpos contra artritis encefalitis caprina (AEC) mediante inmunoelectrotransferencia. *Veterinaria México*, 34:119-127, 2003.
- Tesoro-Cruz E., Feria-Romero I.A., Orozco-Suárez S., Hernández-González R., Silva-García R., Valladares-Salgado A., Bekker-Méndez V.C., Blanco-Favela F. & Aguilar-Setién A. Frequency of the serological reactivity against the caprine arthritis encephalitis lentivirus gp135 in children who consume goat milk. *Archives of Medical Research*, 40:204-207, 2009.
- Thrusfield M.V. Inquéritos, p.223-247. In: Thrusfield M.V. (Ed.), *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. Roca, São Paulo, 2004.
- Torres J.A., Campos G.S., Freitas M.M., Brandão C.F.L. & Sardi S.I. Produção de antígeno viral para o sorodiagnóstico da artrite-encefalite caprina utilizando um teste imunoenzimático (ELISA). *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 8:107-114, 2009.

Legenda da figura

Figura 1. **A.** Eletroforese dos produtos obtidos na ultracentrifugação do antígeno em colchão de sacarose (1- colchão de sacarose; 2 - pré-antígeno; 3 - antígeno UCCS); **B.** Immunoblotting das frações imunogênicas, com destaque para a p28.