

# DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE MAEDI VISNA EM OVINOS

TÂNIA VALESKA MEDEIROS DANTAS,<sup>1\*</sup> SUZANA APARECIDA COSTA DE ARAÚJO,<sup>1</sup> RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO,<sup>2</sup> MARIA ALZIRA DO CARMO ARAGÃO,<sup>1</sup> JEAN BERG ALVES DA SILVA,<sup>1</sup> ARACELY RAFAELLE FERNANDES RICARTE,<sup>1</sup> ADRIANA LOPES RIBEIRO<sup>1</sup> E MARIA FÁTIMA DA SILVA TEIXEIRA<sup>1</sup>

1. Laboratório de Virologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, (PPGCV) Universidade Estadual do Ceará, (UECE), Av. Paranjana 1700, Itapery, CEP 60740-000, Fortaleza, CE, e-mail: taniavet@yahoo.com.br;

2. Pesquisador da EMBRAPA-CNPC.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto para diagnóstico de Maedi Visna (MV). Produziu-se o antígeno em sobrenadantes de cultivo celular de membrana sinovial caprina (MSC) inoculado com o Maedi Visna Vírus (MVV) cepa K1514, que passou por ciclos de congelamento e descongelamento, sendo logo após clarificado por centrifugação a 3.000 g por 40 minutos. A suspensão clarificada foi precipitada por PEG 8000, centrifugada a 12.000 g por 60 minutos, o *pellet* ressuspendido em TNE (Tampão Tris-HCl, NaCl, EDTA) e ultracentrifugado a 42.000 g por 105 minutos em colchão de sacarose, e ressuspendido em PBS contendo *phenylmethylsulphonyl*

*fluoride* (PMSF). Realizou-se o ELISA em microplacas de 96 poços, incubadas por 1h a 37 °C, utilizando-se como revelador o-phenylenediamine (OPD). Para a comparação entre os testes de ELISA e AGID, utilizaram-se 175 amostras de soros. A concentração ótima do antígeno foi a de 2 µg/mL e a melhor diluição dos soros, controles e testes de 1:100. O ELISA detectou um maior número de positivos (40) que o AGID (11), apresentando uma sensibilidade de 91%, especificidade de 82%. O ELISA promoveu uma melhor sensibilidade que o AGID. Embora sua especificidade tenha ficado abaixo do esperado, seu uso pode ser indicado como teste de diagnóstico de MVV.

PALAVRAS-CHAVES: Diagnóstico sorológico, ELISA, lentivírus ovino, MaediVisna.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF AN INDIRECT ELISA FOR THE DIAGNOSIS MAEDI-VISNA IN SHEEP

The objective of this work was to develop and standardize an indirect ELISA for diagnosis of Maedi Visna (MV) infection. The antigen was produced from the supernatants of caprine synovial membrane (CSM) cell monolayers inoculated with Maedi Visna virus (MVV), strain K1514, by cycles of freezing and thawed, and clarified by centrifugation at 3000 g for 40 min. The clarified suspension was precipitated with PEG 8000 and centrifugated at 12000 g for 60 min; the pellet was resuspended in 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 performed in 96 wells plates, incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was detected by incubation with the enzyme substrate and o-phenylenediamine (OPD) during 15 min. The tests were compared using 175 sera samples. The concentration of the antigen was 2 µg/mL and the best dilution of the sera was 1:100. ELISA detected more positive samples (22.9%) than AGID (6.3%) and presented a better sensitivity than AGID and, although the specificity was below the expected, it could already be recommended in the diagnosis of MVV infection.

KEY WORDS: ELISA, MaediVisna, serologic diagnosis, sheep lentivirus.

## INTRODUÇÃO

Maedi Visna (MV) é uma importante doença de ovinos e responsável por uma infecção persistente, progressiva e lentamente. 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 posteriormente classificado como membro da família *Retroviridae*. O vírus MaediVisna (MVV) pertence ao gênero *Lentivirus*, assim como o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), que acomete preferencialmente os caprinos. Porém, já foi verificada infecção cruzada tanto para MVV quanto para CAEV em caprinos e ovinos, respectivamente. Em função de suas similaridades e possibilidade de infecção cruzada, esses vírus vêm sendo referidos como lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV – *Small Ruminant Lentivirus*) (PISONI et al., 2005). A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de colostro e leite infectado. O MaediVisna 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. As células maturam para macrófago, e o vírus começa a replicar (NARAYAN et al., 1980).

Inicialmente, a resposta humoral ao MVV é detectada em torno da terceira semana e está principalmente dirigida contra a proteína do capsídeo, sendo que, 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 AGID é capaz de identificar animais experimentalmente infectados com MVV cerca de quatro a cinco meses após a infecção, de modo que, quando comparado com ELISA, mostrou resultados bastante correlacionados. O ELISA, no entanto, pode detectar a infecção de forma mais precoce (sete semanas após o período de inoculação).

As perdas econômicas acarretadas por tal doença são grandes e decorrem de falhas reprodutivas, morte, diminuição da produção láctea e perda de peso dos animais. De acordo com a Resolução 66/94 do MERCOSUL, os países membros do bloco devem certificar-se, em caso de exportação e importação de ovinos, de que o país de origem dos animais seja livre de MaediVisna há pelo menos três anos. Trata-se de normas sanitárias que salientam a importância econômica de controle e erradicação de tais enfermidades.

Por isso, se faz necessário o controle dessa doença, que 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 (AGID) (CUTLIP et al., 1977), recomendado pela OIE, que, apesar de boa especificidade, pode apresentar resultados falsos-negativos (KNOWLES, 1997), a fixação de complemento (TORFASON et al., 1992); *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (HOUWERS et al., 1982) e *imunoblot* (TORFASON et al., 1992). Como o ELISA possui uma alta sensibilidade e reprodutibilidade, tornou-se o método de escolha para um grande número de amostras. Porém, o uso de antígeno importado tem dificultado a rotina do diagnóstico, pelo custo elevado do *kit* (ALMEIDA & LIMA, 2001).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e padronizar um ELISA indireto para a detecção de anticorpos, em ovinos, contra MVV, utilizando o antígeno preparado a partir de vírus completo da cepa MVV K1514, de forma comparativa com o AGID comercial nacional (*Kit* para Diagnóstico de CAE, Biovetech, Brasil), tentando alcançar um teste com custo compatível para avaliar um grande número de animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Na produção do antígeno, utilizaram-se sobrenadantes de cultivo celular de membrana sinovial caprina (MSC) inoculado com 1mL da amostra-padrão (MVV-K1514) com título inicial de  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL, que apresentaram efeito ci-

topático (ECP) característico, como sincícios e lise celular. Os sobrenadantes e o tapete celular foram congelados (-20°C) e descongelados (30°C) sucessivamente três vezes. Após o último descongelamento, a suspensão foi clarificada por centrifugação a 3.000g (rotor IEC 216) a 5°C por 40 minutos, seguida de precipitação com PEG-8000 a 8% por 18h a 4°C, e subsequente centrifugação a 4°C a 12.000g (rotor Sorvall GSA) durante uma hora (REIS & LEITE, 1994). Ressuspendeu-se o sedimento 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, sendo ultracentrifugado em colchão de sacarose (25% em TNE) a 42.000g (rotor Beckman SW 41ti) por 105 min a 3°C (HOUWERS et al., 1982). O sedimento foi ressuspendido em PBS (pH 7,4) contendo  $2 \times 10^{-4}$  mol/L de *phenylmethylsulphonyl fluoride* (PMSF). Determinou-se a concentração de proteína total pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e manteve-se o antígeno a 4°C, até a realização dos ensaios imunoenzimáticos (PINHEIRO, 2001).

Para o ELISA, utilizaram-se concentrações de 2,0 a 0,125 µg/mL de proteína viral. A concentração ótima para o antígeno viral foi determinada pela mais baixa concentração que pode demonstrar a positividade da reação para qualquer diluição (1:50 a 1:400) do soro positivo do *kit* de AGID do Instituto Pourquier®.

Testaram-se quatro diluições de soros (1:50, 1:100, 1:200 e 1:400) com a diluição (1:1000) do conjugado anti-*sheep* IgG Peroxidase. A diluição ótima do soro foi determinada pela diluição que apresentou a maior diferença nas leituras entre os positivos e negativos para a concentração ótima do antígeno (PINHEIRO, 2001).

Padronizou-se o ELISA como recomendado pela FAO/OIE (WRIGHT et al., 1993). Incluíram-se controles-positivo (*pool* de soros positivos na AGID), negativo (*pool* de soros negativos), de antígeno e substrato. Testaram-se soros 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).

Realizou-se o ensaio imunoenzimático indireto em microplacas de 96 poços de fundo chato, sendo cada poço revestido com 100 µL da concentração ótima do antígeno, diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), pela incubação por uma hora a 37°C. Após sensibilização da placa, realizaram-se lavagens sucessivas com solução de lavagem (solução salina 0,9%, 0,05% de Tween 20 - PBS-T), que foi realizada entre todas as etapas, exceto após a adição do substrato. Em seguida, adicionou-se a solução de bloqueio (leite em pó desnatado 2,5% em PBS-T) por uma hora a 37 °C. Os soros-controles e amostras na diluição de 1:100, considerada a melhor diluição, foram distribuídos em duplicata e incubados por uma hora a 37 °C. A seguir, adicionou-se o conjugado em 1:1000 e incubou-se por uma hora a 37°C. A reação foi revelada pela incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz com 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mg de *O-phenylenediamine* (OPD) em 10 mL de PBS-T, seguida de adição de inibidor da reação (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N), e leitura a 490 nm em espectrofotômetro.

Utilizou-se a técnica de AGID, descrita por ABREU et al. (1998), do *kit* nacional da Biovetech®, realizada em agarose a 1%, com 20 µL do soro-teste e 20 µL do soro controle-positivo, e 20 µL do antígeno na cavidade central. Após, as reações foram acondicionadas em câmara úmida, à temperatura ambiente (25 °C) por 48 horas. Avaliaram-se as reações pela presença de linha de precipitação, similar à obtida entre o antígeno e o soro controle-positivo.

Empregaram-se 175 amostras de soros ovinos para comparação entre testes. Para a determinação do *cut off* do ELISA (média das PP do negativo mais três desvios padrões do PP), utilizaram-se 16 amostras de soros provenientes de rebanho com resultados sorológicos negativos por AGID.

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos no ELISA indireto, tomando-se como padrão o teste de AGID, mediante o emprego de antígeno comercial. Avaliaram-se a sensibilidade comparada, a especificidade comparada, o valor preditivo positivo e o negativo e a precisão (MADRUGA et al., 2001). Os resultados

dos testes foram comparados pelo teste do Qui-Quadrado com correção de Yates ( $\chi^2$ ) (TYLER & CULLOR, 1989). Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos dois testes.

## RESULTADOS

Padronizou-se o ELISA para a obtenção da maior diferença entre a DO dos soros positivos e negativos. A concentração ótima do antígeno foi de 2  $\mu\text{g/mL}$ , sendo a diluição do soro de 1:100. Reavaliando-se os 16 soros provenientes de rebanhos negativos para AGID, encontraram-se resultados negativos. O *cut-off* do ELISA foi de 0,898. Esse ELISA detectou maior número de positivos que o AGID. A comparação entre os dois testes nas 175 amostras está demonstrada na Tabela 1. Das 11 amostras positivas no AGID, uma foi negativa no ELISA. Já as 30 amostras negativas no AGID foram positivas no ELISA, mostrando uma sensibilidade de 91%, especificidade de 82%, valor preditivo positivo de 25%, valor preditivo negativo de 99% com precisão de 88% e um índice Kappa de 0,32, o que indicou uma baixa concordância entre os testes. Os dados foram significativos para o Qui-Quadrado ( $p < 0,001$ ).

**TABELA 1.** Comparação dos resultados com soro ovino testado pelo AGID e ELISA

ELISA	AGID		Total
	Positivo (PP $\leq$ 0,898)	Negativo (PP $>$ 0,898)	
Positivo	10	30	40
Negativo	1	134	135
Total	11	164	175

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

PP: percentual de positividade (razão entre a DO da amostra e a DO controle positivo)

## DISCUSSÃO

Na padronização do teste, obteve-se um protocolo com um bom rendimento dos principais componentes da reação (antígenos e conjugados) e boa especificidade dos resultados.

Utilizando-se como controle positivo para o ELISA o soro padrão positivo anti-MVV p-28 do *kit* de AGID do Instituto Pourquier®, apresentaram-se leituras positivas. PINHEIRO (2001), usando o soro reagente do *kit* americano (Caprine Arthritis-Encephalitis/Ovine Progressive Pneumonia Antibody Test Kit. Veterinary Diagnostic Technology, Inc® - USA.), encontrou um valor negativo, provavelmente pelo fato de este soro ser contra gp 135 e o antígeno ser pobre em gp 135. No entanto, pode-se inferir que, no caso deste ELISA, houve positividade, porque o soro era contra p28 e o antígeno com vírus completo possui uma concentração de p28 capaz de detectar positividade. CELER Jr. et al. (1998) verificaram, por *immunoblotting*, que a presença de anticorpos para gp 135 foi evidente em soros extremamente positivos com altos títulos, razão por que 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% dessas 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 dispor de um teste de referência. Segundo KNOWLES (1997), poderiam ser adotados imunoprecipitação e *Western blotting*, como critério independente e seguro para classificação da população em verdadeiros positivos e verdadeiros negativos. Pelas particularidades da patogênese dos SRLV, a determinação do verdadeiro *status* dos animais é difícil, pois a restrição da replicação viral torna o isolamento incerto (CASTRO, 1998).

O AGID foi escolhido como teste-padrão para o diagnóstico de MVV, por ser o teste recomendado pelo OIE (1996) para o exame diag-

nóstico e para comercialização de pequenos ruminantes.

Os resultados obtidos no ELISA mostraram maior sensibilidade que a AGID. Comparando-se este protocolo de ELISA com AGID, verificou-se que aquele detectou 22,9% a mais de animais positivos. CASTRO (1998), CELER JR. et al. (1998), SIMARD & BRISCOE (1990) e PINHEIRO (2001), comparando os mesmos testes, verificaram 44,5%, 25,4%, 15,5% e 15,5% de positividade, respectivamente. Utilizando o ELISA com sistema de amplificação do sinal enzimático pela avidina-biotina, CASTRO (1998) detectou cerca de 84% a mais que o teste AGID, porém com o aumento do custo e do tempo do teste. Deve-se considerar que, além de fatores inerentes aos testes, existem animais com resposta imunológica seletiva para determinados antígenos (JOHNSON et al., 1983; RIMSTAD et al., 1994). O antígeno utilizado no AGID 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 epítomos, para os quais certos animais elaboraram resposta imunológica de intensidade indetectável pelo AGID 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 AGID, 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 SRLV apresenta variações individuais (RIMSTAD et al., 1994). Em consequência de uma maior sensibilidade, o ELISA desenvolvido mostrou-se um teste mais viável que a AGID para utilização no controle da referida infecção.

## CONCLUSÃO

O ELISA indireto produzido apresenta alta sensibilidade e uma boa especificidade. Por isso, pode ser utilizado como teste diagnóstico para MVV em ovinos, por detectar um maior número de animais positivos que o AGID. O protocolo do ELISA desenvolvido utiliza baixa quantidade de reagentes, embora ainda demande um custo superior ao AGID, e realiza exames de 42 amostras por placa. Assim, quando comparado com o AGID, o ELISA é superior no que diz respeito à sensibilidade.

## AGRADECIMENTOS

À EMBRAPA-CNPC, pelo fornecimento de material e por ceder seu laboratório de Patologia Clínica, para realização de parte do trabalho. À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro, em forma de bolsa à mestrandia Tânia V. M. Dantas durante todo o experimento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus Maedi-Visna para imunodifusão em ágar-gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 57-60, 1998.
- ADAMS, D. S.; 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.
- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia**. Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001. 186 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analyst Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASTRO, R. S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. Belo Horizonte, 1998. 132 f. Tese (Doutorado) — Escola de Veterinária, UFMG.

- 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 Bulletin**, v. 45, p. 183-188, 1998.
- CHEBLOUNE, Y.; SHEFFER, D.; KARR, B. M.; STEPHENS, E.; NARAYAN, O. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. **Virology**, v. 222, p. 21-30, 1996.
- 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.
- DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; BRODIE, S. J.; MAGNUS - CORRAL, S.; BOWEN, R. A.; DEMARTINI, J. C. Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal Acquire Immunodeficiency Syndrome Human Retrovirology**, v. 8, p. 116-123, 1995.
- 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.
- 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.
- 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. **Infectivity Immunology**, v. 41, n. 2, p. 657-665, 1983.
- KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for retrovirus infections of small ruminants. *Veterinary Clinical North American: Food Animal Practice*, v. 13, p. 1-11, 1997.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. (Ed.). **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2001. p. 145-175.
- MCGRATH, M.; WHITE, O.; PINCUS, T.; WEISSMAN, I. L. Retrovirus purification: Method that conserves envelope glycoprotein and maximizes infectivity. **Journal of Virology**, v. 25, p. 923-927, 1978.
- MERCOSUL. RESOLUÇÃO nº 66/94. **Normas sanitárias e certificado zoossanitário único para o intercâmbio regional de ovinos**. [s.l.]: GMC, 1994.
- MOTHA, M. X.; RALSTON, J. C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. **Veterinary Microbiology**, v. 38, p. 359-367, 1994.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virology**, 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 leucoencephalitis 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: OIE. 1996. p. 369-373.
- 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, 2001. 115 f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária UFMG.
- PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology**, v. 339, p. 147-152, 2005.
- REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of equine infectious anaemia in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 20, p. 261-267, 1994.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.; DEROCK, E.; HIGGINS, J.; PEDERSEN, N. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **Archive Virology**, v. 134, p. 345-356, 1994.
- SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Archives Gesante Virusforsch**, v. 10, p. 368-381, 1960.
- SIMARD, C. L.; BRISCOE, M. R. An enzyme – linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. **Canada of Journal Veterinary Research**, v. 54, p. 451-456, 1990.
- 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.

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

VITU, C.; RUSSO, P.; VIGNE, R.; QUERAT, G.; GIAUFFRET, A. An ELISA test for detection of Maedi-Visna antibodies: comparative study with Gel immunodiffusion

an complement fixation test. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease**, v. 45, p. 469-481, 1982.

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

---

Protocolado em: 26 abr. 2006. Aceito em: 21 nov. 2007.