

Juliano Cezar Minardi da Cruz

**MONITORAMENTO SOROLÓGICO E DA PRESENÇA DO DNA
PRÓ-VIRAL DO LENTIVÍRUS CAPRINO (CAEV) NO SANGUE
E SÊMEN DE REPRODUTORES INFECTADOS**

**Tese apresentada à UFMG, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor
em Ciência Animal.**

Área: Medicina Veterinária Preventiva

**Orientadora: Aurora Maria Guimarães
Gouveia**

**Belo Horizonte
UFMG-EV
2009**

C957m Cruz, Juliano Cezar Minardi da, 1977-
Monitoramento sorológico e da presença do DNA pró-viral do lentivírus caprino (CAEV) no sangue e sêmen de reprodutores infectados / Juliano Cezar Minardi da Cruz. - 2009.
35 p. : il.

Orientador: Aurora Maria Guimarães Gouveia
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Caprino – Doenças – Teses. 2. Artrite encefalite caprina – Teses. 3. Imunodifusão – Teses. 4. Lentivírus – Teses. I. Gouveia, Aurora Maria Guimarães. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.390 89

Tese defendida e aprovada em 27 de fevereiro de 2009, pela Comissão examinadora constituída por:



Dra. Aurora Maria Guimarães Gouveia
Orientadora



Dra. Alice Andrioli Pinheiro



Dr. Cláudio José Borella Espescht



Dr. Marcelo Fernandes Camargos



Dra. Zélia Inês Portela Lobato

A um anjo chamado Dona Dalva.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão pelo apoio, carinho e amizade de sempre.

À Professora. Aurora Maria Guimarães Gouveia pela oportunidade, orientação, exemplo profissional e de vida.

Ao Prof. Marcos Bryan Heinemann pela dedicação, ensinamentos e amizade.

Aos professores Rômulo Cerqueira Leite e Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pelo apoio e disponibilização do laboratório de Retrovíruses.

Aos colegas Gissandra Farias Braz e Filipe Borges do Carmo pelo companheirismo e apoio imprescindível na fase de campo.

A todos os colegas de curso pelos bons momentos.

Ao Prof. Almir S. Martins do Instituto de Ciências Biológicas – pelo acolhimento e ao Prof. Maurílio A. Rocha pela primeira oportunidade de estágio no depto de Medicina Veterinária Preventiva.

À Dra. Alice Andrioli Pinheiro pela amizade e valiosas orientações e a Embrapa caprinos pelo acolhimento.

Ao Dr. Cláudio José Borella Espeschit pelas orientações e apoio na fase de campo. Às funcionárias Nilda e Deborah do colegiado, Lúcia da manutenção, e Nádia da preventiva pela paciência e dedicação aos alunos.

À Escola de Veterinária da UFMG, pela minha formação como pessoa e profissional.

As empresas Socil, Prodap e Tecnopec pelo apoio ao experimento.

A Capes e FAPEMIG pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

“Todos esses que aí estão
Atravancando meu caminho,
Eles passarão...
Eu Passarinho!”
Mario Quintana

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. LITERATURA CONSULTADA	13
2.1 Etiologia	13
2.2 Histórico	13
2.3 Epidemiologia	14
2.4 Transmissão	14
2.5 Resposta imunológica	15
2.6 Patogenia	15
2.7 Diagnóstico	16
2.8 Sorologia intermitente e soroconversão tardia	18
2.9 Profilaxia	19
2.10 Estratégias de controle	19
2.11 Presença de retrovírus no sêmen	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais	21
3.2 Coleta de amostras de sangue e sêmen	21
3.3 Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)	22
3.4 Extração do DNA pró-viral a partir de amostras de sangue	22
3.5 Extração do DNA pró-viral a partir de amostras de sêmen	22
3.6 Reação em cadeia da polimerase (PCR-nested)	22
3.7 Eletroforese	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Soroconversão e perfil sorológico pós-infecção	26
4.2 DNA pró-viral do CAEV no sangue e sêmen	27
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE QUADOS

Quadro 1 -	Infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) detectada pela presença (+) ou ausência (-) de anticorpos precipitantes (IDGA), ou DNA pró-viral (PCR) no sangue e sêmen de caprinos infectados, em amostras coletadas periodicamente durante 12 meses.....	25
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Primodeteção pós-infecção em sangue e sêmen (PCR- <i>nested</i>) e da soroconversão (IDGA) de caprinos infectados com CAEV amostra de campo (animais 2-5, grupo A e animal 1, grupo C) e amostra padrão Cork (animais 6-10, grupo B).....	26
------------	--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. PCR <i>nested</i> de amostras de sêmen de caprinos infectados com o CAEV, bandas de 185 pb. Controle interno (β -actina endógena), bandas de 393 pb. PM : marcador DNA ladder; C+ : controle positivo; canaleta 1 : amostra animal controle negativo; canaletas 2, 3, 7, 8, 9 : amostras negativas; canaletas 4, 5, 6 e 10 : amostras positivas; canaleta 11 : água.	24
Figura 2 -	Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. PCR <i>nested</i> de amostras de sangue de caprinos infectados com o CAEV, bandas de 185 pb. Controle interno (β -actina endógena), bandas de 393 pb. PM : marcador DNA ladder; canaleta 2 : água; C+ : controle positivo; canaleta 1, 9, 10 : amostras positivas; canaletas 4, 5, 6, 7 e 8 : amostras negativas; canaleta 11 : controle negativo canaleta 12 : amostra animal controle negativo.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
BSA	Albumina sérica bovina
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CAE	Artrite encefalite caprina
CAEV	Vírus da artrite encefalite caprina
CFU	Unidades formadoras de colônia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECP	Efeito citopático
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>env</i>	Gene que codifica as proteínas do envelope viral dos retrovírus
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
<i>gag</i>	Gene viral que codifica as proteínas internas dos retrovírus
gp	Glicoproteína
IA	Inseminação artificial
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
Kb	kilobase
LA	Língua azul
LTR	Seqüências terminais longas repetidas
LVC	Lentivírus caprino
LVPR	Lentivírus de pequenos ruminantes
MEM	Meio essencial mínimo
MIDGA	Microimunodifusão em gel de agarose
MSC	Membrana sinovial caprina
MVV	Vírus do Maedi-Visna
NC	Nucleocapsídeo
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
pb	Pares de bases
PBS	Solução Salina Tamponada por Fosfato
PCAEV	Programa de controle da artrite encefalite caprina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de placas
<i>pol</i>	Gene que codifica as enzimas virais dos retrovírus
<i>rev</i>	Gene de regulação viral dos retrovírus
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SRD	Sem raça definida
<i>tat</i>	Gene de regulação viral
TCID	Dose infectante em cultura de tecido
TE	Transferência de embriões
TM	Transmembrânica
<i>vif</i>	Gene de regulação viral

RESUMO

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença viral multisistêmica que ocorre em caprinos, causada pelo lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV). As medidas preconizadas para o controle do CAEV estão baseadas na identificação dos animais infectados por meio de testes sorológicos. O objetivo deste estudo foi melhorar a eficiência das medidas de controle através da associação de testes indiretos (imunodifusão em gel de agar-IDGA) e diretos (nested-PCR) para o diagnóstico do CAEV. O IDGA foi realizado nos animais ao nascimento antes da colostragem, no dia da infecção experimental e durante 12 meses pós-infecção. Durante um período de 12 meses, o perfil de eliminação do DNA pró-viral do CAEV no sêmen e sua presença no sangue, foram monitorados em um grupo de nove animais experimentalmente infectados. Não foram observados sinais clínicos da CAE durante o período experimental (PE). Ao final do PE, um animal infectado (1/9) permaneceu soronegativo pelo IDGA. Quando submetido à prova de PCR de sêmen este mesmo animal apresentou resultados positivos. A soroconversão tardia parece ser uma característica da infecção pelo CAEV, a qual pode interferir diretamente nos programas de erradicação e estudos epidemiológicos baseados em métodos sorológicos para a identificação de caprinos infectados. Os resultados demonstram que os bodes eliminam o DNA pró-viral do CAEV de maneira intermitente no sêmen ejaculado. Não foi observada relação entre a presença do DNA pró-viral do CAEV no sangue e sua eliminação no sêmen. Os resultados sugerem que as práticas clássicas de manejo preconizadas para o controle, são insuficientes para a erradicação da CAE e que a PCR pode ser uma ferramenta eficiente para minimizar o risco da utilização de reprodutores falso negativos pelo IDGA na reprodução.

Palavras-Chave: caprino, lentivírus, sêmen, LVPR, PCR, soroconversão tardia

ABSTRACT

Caprine arthritis-encephalitis (CAE) is a multisystemic viral syndrome in goats caused by small ruminant lentivirus (CAEV). The control measures prescribed for CAEV control are based on the identification of infected animals through a suitable serological test. The aim of this work was to improve the CAE control measures through the association of indirect (agar gel immunodiffusion-AGID) and direct (nested-PCR) assays to CAEV diagnosis. AGID was performed at birth before colostrum, at day of infection and throughout 12 months pos infection. We studied the viral shedding in a group of nine experimental infected males over a year by following the proviral load by nested-PCR in semen and blood. During the experimental period (EP) no clinical signs of CAE were observed. Throughout the EP one animal (1/9) remained AGID-seronegative to CAEV. When the semen samples were submitted to PCR, that same AGID-seronegative animal showed positive results. Delayed seroconversion appears to be a feature of CAEV infection wich may have direct implications for eradication programs and epidemiologic studies that rely on serologic methods to detect infected goats. Our results suggest that the bucks show intermittent shedding of proviral DNA into ejaculated semen. No significant relationship was found between the presence of proviral CAEV DNA in blood and the detection of proviral CAEV DNA in ejaculates. We conclude that the classical management practices recommended for CAEV control are insufficient in CAEV eradication programs and that PCR may be a useful tool for decreasing the risk of breeding AGID false negative animals.

Keywords: Goat, lentivirus, semen, SRLV, PCR, delayed seroconversion

1 – INTRODUÇÃO

A artrite-encefalite caprina (CAE) é uma doença viral que está disseminada mundialmente, especialmente em países de caprinocultura leiteira desenvolvida. É uma síndrome mutlisistêmica que apresenta infecção persistente, curso lento e progressivo, causado pelo lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV). Animais adultos apresentam com frequência, sinais de artrite, mastite e pneumonia; animais jovens podem apresentar uma leucoencefalomielite.

O tratamento não é efetivo e até o momento não foi desenvolvida uma vacina de eficácia comprovada. Como consequência, outras medidas profiláticas são adotadas para diminuir ou eliminar os danos causados pela doença, tais como a redução da produção de leite, o descarte prematuro e a perda de potencial genético de animais infectados pelo CAEV. A principal via de transmissão do CAEV ocorre verticalmente, de cabras infectadas para suas crias por meio da ingestão de colostro e leite contaminados. As medidas profiláticas estão baseadas na identificação de animais infectados por meio dos testes sorológicos disponíveis, que permitam a segregação ou descarte de animais infectados, e o fornecimento aos cabritos lactantes, de colostro e leite termizados (tratados à 56 °C por 60 min) oriundos de cabras soronegativas.

Entretanto, mesmo com o rigoroso controle do aleitamento adotados nos programas de controle atualmente, este não tem sido totalmente efetivo na erradicação do CAEV nos rebanhos leiteiros infectados. Outras vias que não a ingestão do colostro e leite contaminados pelo vírus podem estar envolvidas na transmissão do vírus. Estudos demonstraram a soroconversão em fêmeas negativas para o CAEV no intervalo de 100 a 140 dias após o acasalamento com machos infectados, sugerindo a possibilidade de transmissão venérea ou por contato com excreções ou secreções contaminadas. Recentemente, o CAEV foi detectado no sêmen de caprinos infectados, sugerindo o potencial risco de transmissão

para as fêmeas através da monta natural ou inseminação artificial (IA). Este fator é agravado pela abrangência da IA, possibilitando que o sêmen contaminado de um reprodutor infectado, seja utilizado em inúmeros rebanhos e em vários países, ampliando os riscos de disseminação da CAE. Este fator é particularmente importante para a indústria da IA, pela imposição de barreiras sanitárias ao comércio internacional de sêmen.

No Brasil, as importações de caprinos de alta linhagem genética leiteira de países endêmicos para o CAEV no início da década de 80, possibilitaram a introdução da doença até então exótica no país, noticiada inicialmente no Rio Grande do Sul e posteriormente em diversos estados brasileiros. A hipótese de transmissão venérea ressalta a importância do estudo sobre a possibilidade de veiculação do lentivírus caprino pelo sêmen e sua consequência nos programas de controle da CAE. Ainda é escassa a literatura versando sobre a presença do CAEV no sêmen, assim como os fatores relacionados à dinâmica viral no trato genital.

Os testes laboratoriais para o diagnóstico da CAE incluem o isolamento do vírus, detecção de ácidos nucleicos e de antígenos virais em células e tecidos, assim como provas sorológicas.

O teste sorológico mais amplamente utilizado para o diagnóstico da CAE é a imunodifusão em gel de agar (IDGA), recomendado pela OIE (Organização Mundial de Saúde Animal) (OIE, 2004). Entretanto, como o IDGA tem sensibilidade analítica pior que testes imunoenzimáticos, ou seja, ela necessita de uma concentração maior de anticorpos específicos para dar um sinal, conseqüentemente parece subestimar a incidência da infecção, especialmente em animais com idade inferior a seis meses, ou nos casos em que ocorra a soroconversão tardia, característica observada na infecção pelo CAEV.

A ocorrência de resultados falso-negativos decorrentes da soroconversão tardia pode

impedir a precocidade e a precisão do diagnóstico sorológico de animais infectados, permitindo a estes atuarem como reservatórios da infecção para o rebanho. As práticas clássicas de manejo recomendadas para o controle e a utilização das provas de diagnóstico disponíveis de maneira isolada, tem se mostrado insuficientes no êxito de programas de erradicação do CAEV. Embora apresentando maior complexidade e custo comparado aos testes sorológicos, o diagnóstico por meio da PCR pode ser adequado à algumas circunstâncias, funcionando como contra prova frente aos testes sorológicos, e permitindo maior precocidade na identificação de animais que apresentem soroconversão tardia.

A associação do diagnóstico sorológico e molecular pode potencializar a eficiência dos programas de erradicação da CAE, e minimizar o risco da utilização de reprodutores falso - negativos (pela prova de IDGA), além de gerar informações sobre a dinâmica viral no sangue, sêmen e da resposta sorológica frente à infecção pelo CAEV.

O objetivo deste estudo foi monitorar a presença de anticorpos (frente ao CAEV) no soro e do DNA pró-viral no sangue; e descrever o padrão de eliminação do CAEV (DNA pró-viral) no sêmen de reprodutores caprinos experimentalmente infectados.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1. Etiologia

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade distribuída mundialmente causada pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) (Peterhans *et al.*, 2004). Em conjunto com outros vírus que infectam os ovinos (maedi-visna), bovinos (vírus da imunodeficiência bovina), felinos (vírus da imunodeficiência felina), equinos (vírus da anemia infecciosa equina), símios (vírus da imunodeficiência símia) e humanos (vírus da imunodeficiência adquirida) pertence ao gênero Lentivírus que compõem à família *retroviridae* (Callado *et al.*, 2001). A infecção pelo CAEV apresenta uma evolução lenta,

caracterizada por artrite crônica, mamite e pneumonia intersticial, sintomas comumente observados em animais adultos (Narayan *et al.*, 1980). Nos animais jovens, com menos de seis meses de idade, observa-se esporadicamente sinais neurológicos provocados por encefalomielite (Cork *et al.*, 1974).

O genoma é composto de duas moléculas idênticas de RNA, lineares, de cadeia simples, não complementares e de polaridade positiva com tamanho de aproximadamente 10 Kb. O genoma do CAEV é formado pelos genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), os quais são traduzidos em proteínas estruturais, regulatórias (*tat* e *rev*) e auxiliares (*vif*, *vpr/vpx*, *vpu* e *nef*) e por duas LTR (*long terminal repeats* – seqüências longas repetidas) localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma; e que contêm toda a informação essencial para o início e término da transcrição (Saltarelli *et al.*, 1990). O RNA genômico, através da transcriptase reversa, origina o DNA pró-viral, que se integra ao genoma da célula hospedeira, sendo então denominado de provírus.

2.2. Histórico

Relatos sugerem que o primeiro reconhecimento clínico da CAE tenha ocorrido na Suíça em 1959, onde foram observados sinais de artrite crônica em caprinos adultos (Stünzi *et al.*, 1964). Na Índia, foram descritas alterações respiratórias semelhantes à Maedi em caprinos (Rajya e Singh, 1964), enquanto no Japão autores relataram alterações histopatológicas de poliartrite crônica em caprinos (Nakagawa *et al.*, 1971). O indício de que a enfermidade era causada por um vírus, foi confirmado pela microscopia eletrônica, por meio da visualização de partículas virais semelhantes às do vírus Maedi-Visna, em células do plexo coróide caprino (Weinhold, 1974).

A infecção de caprinos caracterizada por artrite progressiva em adultos e encefalomielite desmielinizante em cabritos foi primeiramente relatada por Cork *et al.* (1974), após a ocorrência de um surto de

leucoencefalomielite nos Estados Unidos em animais de um a quatro meses de idade. Estudos virológicos e epidemiológicos revelaram que um mesmo vírus estava relacionado tanto à causa de sinovite e artrite crônica proliferativa em animais adultos, quanto à leucoencefalomielite em cabritos (Cork *et al.*, 1974; Clements *et al.*, 1980). O reconhecimento da CAE como uma infecção viral de ocorrência mundial ocorreu em 1980, após a identificação do agente, classificado como um lentivírus da família *Retroviridae*, denominado CAEV (Crawford *et al.*, 1980; Narayan *et al.*, 1980).

2.3. Epidemiologia

A CAE está presente na maioria dos países e continentes que exploram a caprinocultura como atividade econômica, entretanto observa-se uma maior prevalência nos rebanhos de países que apresentam um alto nível de tecnificação (Rowe e East, 1997). Nos rebanhos infectados, a doença geralmente promove perdas econômicas em consequência à diminuição da produção leiteira e vida útil das cabras, descarte precoce e involuntário de animais de alto valor zootécnico, e despesas com a adoção de programas de controle e/ou erradicação (Peterhans *et al.*, 2004).

Particularmente na Europa, e em países como Estados Unidos e Canadá, estudos em rebanhos leiteiros relatam a prevalência da CAE entre 30 a 80%, índices considerados altos quando comparados aos encontrados na África e América do Sul, entre 0-10% de rebanhos infectados (Crawford e Adams, 1981; Adams *et al.*, 1984; East *et al.*, 1987; Phelps e Smith, 1993; Rowe e East, 1997). A Islândia, Nova Zelândia e Austrália estão atualmente livres das lentivirose de pequenos ruminantes (Thomar, 2005).

No Brasil, a doença foi primeiramente relatada por Moojen *et al.* (1986) no Rio Grande do Sul. Posteriormente ao primeiro relato, a CAE foi detectada em vários Estados da Federação, entre eles: Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais (Yorinori *et al.*, 2003), Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro

e São Paulo (Assis e Gouveia, 1994; Gouveia, 2003) Em países que importam raças exóticas leiteiras para o melhoramento genético dos rebanhos nativos, observa-se uma prevalência baixa ou a não ocorrência do CAEV em animais de raças nativas, particularmente nos rebanhos sem o prévio contato com os exemplares de raças exóticas. A prevalência da enfermidade é maior em rebanhos de exploração intensiva e tecnificada, particularmente naqueles em que os plantéis são compostos por indivíduos de raças leiteiras especializadas (Smith e Sherman, 1994). Destaca-se a relevância do papel epidemiológico de reprodutores caprinos soropositivos para CAE na disseminação da doença em rebanhos nativos, visto que com frequência observa-se a introdução de reprodutores leiteiros de raças exóticas em rebanhos nativos livres da CAE, sem o prévio monitoramento do estado sanitário destes reprodutores quanto à presença do CAEV (Andreoli e Gouveia, 2001).

2.4. Transmissão

O CAEV replica-se preferencialmente em células do sistema monocítico-fagocitário, ou seja, em monócitos no sangue e macrófagos nos demais tecidos, sendo a medula óssea o principal reservatório de células infectadas. O reservatório viral e importante fonte de infecção nos rebanhos, são os animais infectados que transmitem o agente por meio de secreções ou excreções que contenham células do sistema monocítico-fagocitário. Entre os caprinos, a principal via de transmissão ocorre das cabras para os filhotes pela ingestão de colostro e leite contaminados pelo CAEV (Adams *et al.*, 1983; Blacklaws *et al.*, 2004).

A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto entre animais (urina, saliva, secreções respiratória e fezes), assumindo uma maior importância em rebanhos com densidade elevada. O equipamento de ordenha mecânica contaminado pelo leite de animais infectados, torna-se um vetor eficiente de disseminação do CAEV quando manejado de maneira inadequada (Adams *et al.*, 1983). Foi detectada a presença do CAEV em células e fluídos dos tecidos

reprodutores masculinos e femininos, no entanto, a transmissão venérea ainda não foi comprovada (Andrioli *et al.*, 1999; Ali Al Ahmad *et al.*, 2006; Andreoli *et al.*, 2006; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008). Foi observado em pequenos rebanhos de criação mista (caprinos e ovinos), a transmissão natural interespecífica da cepa classificada como subtipo A4 do lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) (Shah *et al.*, 2004).

2.5. Resposta imunológica

O CAEV é introduzido no organismo do animal susceptível geralmente por via oral, onde macrófagos infectados ou partículas virais livres são absorvidos. Em seguida o vírus infecta células do sistema monocítico-fagocitário, produzindo a infecção persistente no hospedeiro. As respostas imunológicas (celular e humoral) possuem intensidade variada e são ineficientes contra a replicação viral. A primeira resposta humoral 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 (nucleocapsídeo, matriz, transmembrânica e de superfície).

Os anticorpos passivos adquiridos pela ingestão persistem em níveis detectáveis no soro de cabritos até aproximadamente seis meses (Mackenzie *et al.*, 1987). Quando a resposta imune se desenvolve, os anticorpos permanecem por toda a vida do animal, apesar de sua concentração variar em diferentes períodos (Perk, 1990). Os anticorpos neutralizantes são produzidos em quantidades limitadas, tardiamente e são de baixa afinidade, de modo que não impedem o ciclo de replicação, porém favorece a persistência do estímulo antigênico. Além disso, a presença de ácidos siálicos na superfície da partícula viral dificulta a ação de anticorpos neutralizantes, e a alta mutabilidade do agente em variantes antigênicas, funcionam como mecanismo de escape da resposta celular e humoral (Knowles *et al.*, 1990; Cheevers *et al.*, 1993).

A replicação viral geralmente é limitada por determinados fatores, entre eles está a

restrição da replicação mediada pelo interferon, produzido pelos linfócitos ativado durante sua interação com os macrófagos infectados. O interferon inibe a maturação dos monócitos, retardando a maturação viral (Zink *et al.*, 1987). Na infecção persistente, existe ainda uma restrição gênica nos monócitos, processamento incompleto da glicoproteína de superfície com interrupção do ciclo viral (Chebloune *et al.*, 1996 a e b).

A disseminação do vírus provavelmente ocorre pela via hematogênica. Nos tecidos-alvo, tais como sinóvia, interstício pulmonar, plexo coróide e úbere, a ativação da replicação viral, juntamente com a maturação dos macrófagos, induzem a formação das lesões linfoproliferativas que caracterizam a CAE. A base do desenvolvimento das lesões parece ser a infecção dos macrófagos. Em resposta ao vírus, a formação de imunocomplexos e a replicação lítica nos macrófagos podem ser as causas das lesões desencadeadas (De La Concha-Bermejillo, 1997). Outra resposta a infecção persistente dos macrófagos, seria a apresentação do antígeno aos linfócitos T, promovendo a cascata de respostas celulares que levariam à proliferação de células inflamatórias mononucleares. Ainda é sugerido, principalmente no caso da artrite, que a infecção dos macrófagos poderia torná-los menos ativos na fagocitose de debris celulares presentes na articulação, resultando no seu acúmulo e na persistência e evolução crônica da artrite (Wilkerson *et al.*, 1995).

2.6. Patogenia

O desenvolvimento das lesões depende do tropismo dos órgãos alvo por células do sistema monocítico-fagocitário, de fatores que induzem a maturação e diferenciação celular, regulação positiva da expressão viral e produção celular. Outro fator importante é a liberação a partir de células lesadas de fatores quimiotáticos que atraem células inflamatórias (Legastelois *et al.*, 1996). A produção persistente e interação entre antígenos virais e os anticorpos, formando imunocomplexos, representam uma das bases imunopatológicas para a evolução

das lesões (Knowles *et al.*, 1990). É provável ainda, que infecções oportunistas possam induzir à secreção de fatores celulares que modulem a replicação e expressão da infecção. Finalmente, a frequência e severidade das lesões parece estarem associadas ao genoma do hospedeiro (De La Concha-Bermejillo *et al.*, 1995) e a amostra viral (Cheevers e McGuire, 1988).

A infecção pelo CAEV, persistente e geralmente assintomática, pode causar afecção multissistêmica, de evolução crônica com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte. Do ponto de vista clínico e anatomopatológico a expressão da infecção pelo CAEV pode ser classificada em quatro formas básicas: nervosa, artrítica, respiratória e mamária (Narayan e Cork, 1985).

A forma mais importante em caprinos é a artrítica, principalmente observada em animais com mais de oito meses de idade. As alterações nas articulações carpianas, como aumento na consistência e volume, são observadas com maior frequência (Crawford e Adams, 1981). A apresentação pulmonar é rara e de pouca gravidade nos caprinos, quando presente os sinais são tosse, dispnéia após esforço físico, taquipnéia, macicez pulmonar e comprometimento do estado geral (Narayan e Cork, 1985). A forma nervosa é menos frequente e geralmente acomete cabritos de um a quatro meses de idade, ou mais raramente em caprinos mais velhos, em associação a forma artrítica (Cork *et al.*, 1974).

A forma mamária é frequente e tem grande impacto econômico, devido ao comprometimento da produção de leite e predisposição a infecções secundárias da glândula mamária (Leitner *et al.*, 2009). As cabras afetadas apresentam mamite aguda ou crônica. A aguda é observada no início da lactogênese, pelo endurecimento não edematoso do órgão com produção baixa de leite ou mesmo agalactia. A crônica instala-se durante a lactação com assimetria e

endurecimento da glândula mamária e com produção de leite normal.

2.7. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo CAEV pode ser realizado pela observação dos sinais causados pelo acometimento dos tecidos nervoso, articular, mamário e pulmonar. Contudo, observa-se que apenas 35% dos animais infectados apresentam sinais clínicos da doença (East *et al.*, 1987; Wilkerson *et al.*, 1995). Após a infecção, os animais produzem anticorpos frente ao CAEV, e a soroconversão pode ocorrer no intervalo de semanas a vários meses. A doença clínica é raramente observada antes dos dois anos de idade, salvo os casos de encefalite acometendo animais jovens (Narayan e Cork, 1985). A sorologia é a abordagem diagnóstica mais comumente utilizada na detecção da infecção pelo CAEV. Várias técnicas de diagnóstico estão disponíveis para este propósito, dentre elas: a imunodifusão em gel de agar (IDGA) (Pinheiro *et al.*, 2005), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), radioimunoprecipitação (RIPA), radioimunoensaio (RIA) e western blotting (WB) (De Andres *et al.*, 2005) e dot blotting (Pinheiro *et al.*, 2006).

O teste sorológico mais comumente utilizado para triagem de rotina é o IDGA, sendo o teste recomendado pela OIE por questões regulatórias. O IDGA baseia-se na detecção de anticorpos ao antígeno do nucleocapsídeo (p25) e do envelope viral (gp135). Um estudo relatou ao testar 218 amostras de campo, uma sensibilidade e especificidade diagnóstica de 91% e 100%, respectivamente, obtidas por IDGA confrontadas com o RIPA (Knowles *et al.*, 1994).

Os ensaios imunoenzimáticos podem ser categorizados de maneira ampla, considerando-se a forma de apresentação dos antígenos utilizados, seja pelo vírus completo, ou proteínas recombinantes, e os denominados ELISAs competitivos, baseados no uso de anticorpos monoclonais (De Andres *et al.*, 2005). Nos testes que utilizam o vírus completo como antígeno, os

valores de sensibilidade diagnóstica variam de 92 a 100%, e para especificidade diagnóstica, estes variam de 93 a 100% (Celer *et al.*, 1993). Os testes de ELISA têm apresentado uma maior sensibilidade analítica quando comparados ao teste de IDGA, e alguns estudos demonstraram que a detecção da soroconversão em estágios mais precoces da infecção foi obtida pelo ELISA (Saman *et al.*, 1999). Os testes de RIPA, RIA e WB são considerados como complementares e não têm sido aplicados como testes de triagem na rotina devido à complexidade das técnicas e o maior tempo de realização demandado.

Vários estudos descrevem o uso da reação em cadeia pela polimerase (PCR) na detecção do CAEV em sangue e tecidos (De Andres *et al.*, 2005). Nestes estudos, observa-se que a variação das amostras de campo e a baixa carga viral *in vivo* são os principais obstáculos encontrados na padronização das provas de PCR para o diagnóstico da CAE. As seqüências alvo estão baseadas no genoma completo, e incluem os genes LTR, *gag*, *pol* e *env*. As regiões dos genes LTR e *pol* são consideradas mais conservadas comparadas ao gene *gag*, enquanto a região do *env* apresenta a maior variabilidade. Entretanto, estudos descreveram PCRs com iniciadores desenhados a partir de regiões dos genes *gag* e *pol* e observaram que os resultados baseados no gene *gag* foram superiores (Zanoni *et al.*, 1990). Na maioria dos estudos, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) são utilizadas na extração do DNA alvo. Utilizando esta abordagem Rimstad *et al.* (1993) detectaram o DNA do CAEV em 25 amostras de sangue de 30 cabras soropositivas. Em 81 caprinos soronegativos, os mesmos autores encontraram vinte animais positivos pela PCR, sendo que destes, dez soroconverteram em estágios mais avançados da infecção (Barlough *et al.*, 1994). Foi desenvolvido um “*Double-nested PCR*” utilizando iniciadores para regiões dos genes *gag* e *pol* na mesma reação de amplificação. Os resultados demonstraram que a PCR apresentou sensibilidade e

especificidade diagnóstica de 94,7 e 87,5%, respectivamente, estas relativas ao teste de ELISA p28 recombinante (Rimstad *et al.*, 1994). Travassos *et al.* (1998) observaram que iniciadores para a região do *env* detectaram 14/15 (93,2%) caprinos infectados, enquanto os iniciadores baseados no gene *gag* detectaram 9/15 (60%). O estudo mostrou que a PCR baseada em seqüências do gene *env* pode ser eficiente em detectar animais infectados apesar da maior variabilidade presumida para esta região do genoma.

A presença do CAEV em amostras de leite, fluido sinovial, sêmen e fluido uterino foi detectada pela PCR. Reddy *et al.* (1993) detectaram o vírus em 8/8 amostras de leite e em 5/5 amostras de fluido sinovial de caprinos infectados, enquanto 18/20 amostras de PBMCs foram positivas. Rimstad *et al.* (1993) encontraram 17/72 amostras de leite e 24/72 amostras de sangue positivas, usando iniciadores da região *gag*. Leroux *et al.*, (1997) utilizando a técnica de RT-PCR semi-nested detectaram a presença do CAEV em 9/9 amostras de leite de cabras infectadas. Em geral, os resultados destes estudos mostram que as provas de PCR tendem a ser menos sensíveis que os testes de ELISA, embora a PCR apresente maior eficiência na detecção da doença antes da soroconversão. Estudos recentes demonstraram por meio da PCR, a presença do CAEV no sêmen (Travassos *et al.*, 1998; Andrioli *et al.*, 1999; Ali Al ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008), no trato genital e fluido uterino de cabras (Andrioli e Gouveia, 2001; Fieni *et al.*, 2003; Ali Al Ahmad *et al.*, 2005).

Os resultados levantados sugerem que a associação entre os testes sorológicos e a PCR podem potencializar a detecção do CAEV em animais infectados. Como exemplo, na erradicação em nível de rebanho, a PCR poderia ser utilizada para testar amostras de animais soronegativos. Em programas de reprodução, o teste de amostras de sangue e sêmen de animais soronegativos ao IDGA ou ELISA pode diminuir o risco da utilização de reprodutores falso-negativos.

2.8. Sorologia intermitente e soroconversão tardia

Estudos sugerem que após a soroconversão, os níveis de anticorpos produzidos contra o CAEV pelo sistema imunológico tendem ao limiar máximo, detectado geralmente na terceira semana pós-infecção, declinando em seguida até atingirem um patamar estável (Adams *et al.*, 1980; Cheevers *et al.*, 1988). Contudo, outros autores observaram respostas com perfis intermitentes da produção de anticorpos, mensurados pelos testes de IDGA, ELISA e WB e observados em animais monitorados em diferentes períodos (Rowe *et al.*, 1992; Rimstad *et al.*, 1993; Hanson *et al.*, 1996). Esses estudos mostram flutuações independentes para anticorpos contra a p25, p16, p14 e proteínas do envelope por períodos de semanas ou mesmo meses. As razões para tais flutuações entre resultados positivos e negativos ainda permanecem obscuras. Uma justificativa plausível seria a redução dos níveis de anticorpos a um patamar abaixo do limiar de detecção do testes utilizados. Alternativamente, a interação biológica entre cepas do vírus de campo altamente variáveis e o genoma do hospedeiro pode contribuir para tal flutuação. Diferenças biológicas entre as amostras mantidas em laboratório usadas para infecção experimental e infecções naturais foram observadas em relação à produção de anticorpos, onde as infecções experimentais apresentaram títulos mais elevados, enquanto as infecções naturais tenderam a títulos menos consistentes (Klein *et al.*, 1985).

A flutuação na produção de anticorpos também foi observada em estudos realizados por outros autores, onde 1/10 e 2/10 animais monitorados apresentam intermitência no perfil da resposta por anticorpos. Hanson *et al.* (1996) observaram que os anticorpos contra p28 ou gp 135 flutuaram entre positivo e negativo em 5/19 animais, enquanto que em outros 5/19 animais os anticorpos desapareceram completamente usando o teste de IDGA. A perda de anticorpos pode também ocorrer com o aparecimento dos sinais clínicos, mas

podem estar presentes em animais com doença subclínica como demonstrado pelo estudo de Houwers e Nauta (1989), que utilizaram o teste de WB. Seja qual for a da razão e extensão deste fenômeno, a flutuação ou mesmo perda de anticorpos representam um importante entrave ao diagnóstico e por sua vez ao controle e erradicação da infecção pelo CAEV.

2.9. Profilaxia

As primeiras tentativas de imunização de pequenos ruminantes frente às lentivirose, basearam-se na utilização de vírus atenuado, entretanto, este tipo de abordagem não obteve sucesso. As imunizações por meio de clones, vírus geneticamente modificados ou plasmídeos recombinantes, são alternativas recentemente utilizadas em detrimento à imunização clássica (Reina *et al.*, 2009). Na imunização de caprinos, respostas significativas dos linfócitos Th1 auxiliares e proteção frente ao CAEV, foram obtidas com a utilização de vacinas de plasmídios recombinantes, codificantes para o gene *env*. Resultados semelhantes foram observados frente à mesma vacina, associada ou não aos plasmídios codificantes para os genes *tat*, interferon (IFN)- γ ou interleucina (IL)-12 (Hotzel e Cheevers, 2003). Entretanto, a imunização com peptídeos *gag* contendo epítopos de células T parece resultar no aumento da carga pró-viral após o desafio (Nenci *et al.*, 2007). A imunização utilizando o CAEV geneticamente modificado, com a deleção dos genes *vif*, *tat* e da *dUTPase* resultaram na redução da carga viral e das lesões (Harmache *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003). A infecção de animais com o vírus ou DNA pró-viral com deleção do gene *tat*, resultou em infecção persistente em cabras, mas conferiu proteção após o desafio (Harmache *et al.*, 1998). As estratégias de imunização utilizadas até o momento têm conferido uma proteção considerável, mas ainda apresentam eficiência limitada e não podem ser aplicadas de forma satisfatória em condições de campo com os procedimentos atualmente disponíveis.

2.10. Estratégias de controle

Após a erradicação do lentivírus ovino (Maedi-Visna) na Islândia (Peterhans *et al.*, 2004), esquemas de controle semelhantes foram adotados nos países europeus, incluindo a Noruega, Finlândia, Bélgica, Dinamarca, França, Holanda, Suécia, Suíça, assim como nos Estados Unidos e Canadá (Nuotio *et al.*, 2003). A redução da prevalência da CAE ocorre na diminuição da incidência da manifestação clínica da doença, evitando as perdas nos parâmetros produtivos de animais adultos e jovens. Além disso, contribui para o bem-estar e prolongamento da vida produtiva do rebanho (Reina *et al.*, 2009). A obtenção da condição de livre de CAEV em rebanhos e centrais de inseminação artificial tem como objetivo garantir uma maior segurança no trânsito de animais e sêmen, agregando um maior valor ao produto comercial pela minimização do risco de disseminação da doença entre rebanhos.

O diagnóstico precoce é essencial para a prevenção e o controle da infecção pelo CAEV e não deve ser baseado apenas na observação de sinais clínicos, uma vez que estes podem ocorrer somente em estágios avançados da infecção e não são específicos aos lentivírus de pequenos ruminantes (De Andres *et al.*, 2005). A determinação da prevalência da doença deve ser o procedimento inicial de norteamo de um esquema de controle e/ou erradicação da CAE (Peterhans *et al.*, 2004). Os testes sorológicos, associados a PCR como técnica confirmatória, podem ser aplicados para consolidar a condição do rebanho (Modolo *et al.*, 2009). Os rebanhos precisam ser monitorados com frequência, por períodos não inferiores a doze meses, iniciando-se o rastreamento da doença nos animais com idade igual ou superior a seis meses (Reina *et al.*, 2009).

Ao iniciar-se um esquema de controle, é importante considerar a prevalência da doença, o tipo de exploração e os procedimentos de manejo adotados em cada rebanho. Após os resultados do rastreamento, é importante que os rebanhos sejam classificados de acordo com a

soroprevalência, por exemplo, alta (>70%), intermediária (40-69%), baixa (10-39%), muito baixa (1-9%) e negativa (Reina *et al.*, 2009). A próxima etapa é determinar as estratégias mais eficientes e econômicas que possibilitem a redução gradual da prevalência em direção a completa eliminação da infecção do rebanho. Em rebanhos positivos, medidas restritivas devem ser adotadas o mais precocemente possível. Entre estas medidas estão o bloqueio do trânsito de animais, exceto para o abate; a comercialização de produtos de origem destes rebanhos deve estar sob controle veterinário; e deve ser evitado o contato de animais positivos com rebanhos de propriedades limítrofes (Nuotio *et al.*, 2003; Peterhans *et al.*, 2004).

O controle da CAE não está requerido por lei na maioria dos países. Contudo, sua efetividade depende do esforço conjunto entre as associações de criadores e os governos locais (Peterhans *et al.*, 2004).

O Brasil possui uma população de caprinos heterogênea em relação à soroprevalência, assim como a variedade das raças, condições ambientais e características de manejo. Esses fatores são alguns dos obstáculos para a implementação de uma política ou estratégia de controle de referência. Uma medida importante é o estabelecimento de um laboratório de referência nacional em cada país para realizar e coordenar as ações e o rastreamento da doença. A este laboratório cabe a responsabilidade de estabelecer os critérios de identificação e monitoramento da doença, distribuição da informação sobre a adequação das ferramentas de diagnóstico, estratégias de rastreamento e manejo dos rebanhos infectados. Outra atribuição importante ao laboratório de referência seria a participação na elaboração da legislação que rege os programas de controle e erradicação, assim como as medidas restritivas ao comércio de animais, produtos e fornecimento da documentação de certificação sanitária dos rebanhos (Reina *et al.*, 2009).

O abate sanitário de rebanhos infectados pelos LVPR e sua reposição com animais

livres foi uma estratégia efetiva de controle da epidemia na Islândia (Blacklaws *et al.*, 2004). Esta medida pode ser aplicada com eficiência em rebanhos com baixa prevalência ou em áreas com um número relativamente baixo de animais (< 1 milhão). Países como a Polônia, Suíça, Bélgica e Malta são exemplos. Obviamente, o abate sanitário não pode ser uma medida sistematicamente aplicada em rebanhos com alta prevalência, ou países que possuam um expressivo número de animais, como França, Espanha, Grécia e Brasil com 1, 2, 5 e 9 milhões de caprinos, respectivamente (Reina *et al.*, 2009). Além disso, esta medida poderia incorrer na perda completa de ganhos genéticos obtidos pelos programas de seleção e melhoramento genético. O descarte direcionado de animais soropositivos, com ou sem sua progênie, tem sido aplicado com relativo êxito (Blacklaws *et al.*, 2004). Utilizando esta estratégia a prevalência em alguns países foi reduzida de 30% a 0% em períodos entre 2-7 anos (Peterhans *et al.*, 2004). Quando a reposição de animais infectados por animais livres não é um procedimento viável, ou prevalência no rebanho é alta, uma medida alternativa seria a segregação, com a criação de um rebanho positivo e outro negativo. Esta medida se aplicada com critério e monitoramento rigoroso, pode controlar a infecção dentro de um período relativamente curto (Reina *et al.*, 2009).

O isolamento dos recém-nascidos permite a conservação dos ganhos genéticos. Os filhotes devem ser concebidos por meio de cesariana ou retirados de suas mães imediatamente após o parto, impedindo o contato físico entre mãe e cria (Nuotio *et al.*, 2003; Blacklaws *et al.*, 2004). É relevante que os neonatos recebem colostro e leite não contaminados pelo CAEV, ou recebam o aleitamento com sucedâneos de leite de cabra (Berriatua *et al.*, 2003). A reintrodução de animais jovens ao rebanho (entre a desmama e a primeira lactação) expõe os mesmos ao risco de nova infecção. É prudente a formação de um novo rebanho ou a ampliação do rebanho não infectado. Em seqüência, o monitoramento sorológico deve ser realizado periodicamente.

O risco de transmissão pelo contato sexual ainda não foi comprovado, embora estudos tenham demonstrado a presença do CAEV no sêmen (Travassos *et al.*, 1998; Andrioli *et al.*, 1999; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008). O uso do sêmen processado para a IA parece apresentar um risco menor, embora estudos mais específicos sejam requeridos para que este seja determinado e assim considerado nos esquemas de controle. Em programas reprodutivos, a associação dos diagnósticos sorológico e biomolecular de amostras do sangue e sêmen de doadores nas centrais de IA e dos reprodutores nas propriedades, pode ser úteis no controle da infecção pela via sexual, uma vez que não existem relatos sobre a transmissão da fêmea para o macho. Contudo, os procedimentos clássicos de manejo recomendados para o controle da CAE não têm considerado o risco da introdução do CAEV no rebanho pelo sêmen e/ou reprodutores infectados. Este fator tem maior importância em rebanhos livres ou mesmo naqueles em fase de erradicação, considerando-se a possibilidade de reintrodução do vírus carregado pelo sêmen de animais falso-negativos no rastreamento sorológico (Modolo *et al.*, 2009).

2.11. Presença do retrovírus no sêmen

Pouco após a descrição dos primeiros casos de infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) no homem, foi levantada a hipótese de transmissão pelo sêmen (Gupta *et al.*, 2000). Nas últimas décadas, inúmeros estudos foram realizados no tema, no entanto, muitas questões sobre a infecção pelos retrovírus no trato genital masculino permanecem sem resposta. No homem, o sêmen de indivíduos soropositivos para o HIV ainda representa a principal via de transmissão da doença (Le Tortorec e Dejucq-Rainsford, 2007). No vírus da imunodeficiência felina, um lentivírus que infecta felinos domésticos e selvagens, foi relatada a detecção do agente em células não-espermáticas do sêmen (Jordan *et al.*, 1995).

Em ovinos observaram a eliminação do MVV no sêmen, e que esta, tinha maior

significância em reprodutores co-infectados com *Brucella ovis* (De La Concha-Bermejillo *et al.*, 1996). Dus Santos *et al.* (2007) ao avaliar amostras congeladas de sêmen de touros, encontraram a presença do genoma do vírus da leucose bovina (BLV). Andrioli *et al.* (1999) detectaram a eliminação do DNA pró-viral do CAEV em amostras de sêmen e encontraram variação na detecção do CAEV em amostras de sêmen lavado e não lavado, em caprinos naturalmente infectados, expostos ou não a trauma testicular.

Travassos *et al.* (1998) relataram a presença do CAEV no sêmen de reprodutores caprinos experimental e naturalmente infectados. Recentemente, alguns autores demonstraram a presença do vírus no sêmen e no trato genital de caprinos (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008). Nos caprinos não foi relatada a transmissão venérea do CAEV. No entanto, com base nos resultados de suas pesquisas, esses mesmos autores levantaram a hipótese do risco de transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen (Travassos *et al.*, 1998; Andrioli *et al.*, 1999; Andrioli *et al.*, 2006; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008; Peterson *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Doze caprinos machos procedentes de criatórios comerciais foram utilizados (11 soronegativos e um soropositivo para o CAEV), com 10 meses de idade ao início do experimento, sendo das raças Alpina (3), Toggenburg (5) e Saanen (4). Os animais selecionados não apresentavam manifestações clínicas da enfermidade, sendo a presença ou não da infecção investigada pela IDGA e PCR *nested* de amostras de sangue. Os animais foram mantidos em sistema intensivo na Fazenda Modelo da Escola de Veterinária da UFMG, localizada no município de Pedro Leopoldo (MG). Cada animal foi alojado em baia individual e alimentado com capim elefante e feno de gramínea, sendo suplementado diariamente com 800g de ração balanceada (18% de proteína bruta), mistura mineral e água. Os animais foram divididos em quatro

grupos experimentais.

a) Grupo A: Quatro animais soronegativos, infectados experimentalmente com o sangue de um animal naturalmente infectado (soropositivo). Nos animais deste grupo, alíquotas de 2 mL do sangue de um animal positivo para CAEV pela PCR e IDGA, serviram como espécime infectante (sem título conhecido) inoculado em quatro animais soronegativos.

b) Grupo B: Cinco animais soronegativos, os quais foram infectados experimentalmente com o CAEV. Nos animais deste grupo foi realizada a inoculação de cultura de células sinoviais infectadas com a amostra padrão Cork (título infectante de 10^6 TCID₅₀/mL), suspensa em 2 mL de meio de cultura.

c) Grupo C: Um animal naturalmente infectado, soropositivo pelo teste de IDGA e positivo pelo teste de PCR de amostra de sangue.

d) Grupo D (controle): dois caprinos soronegativos que foram inoculados com 2 mL de suspensão de cultura de células sinoviais não infectadas.

Todos os animais infectados experimentalmente foram inoculados pela via intravenosa, utilizando-se a veia jugular. Os animais foram monitorados por meio de sorologia (IDGA) e PCR de amostras de sangue e sêmen por um período de 12 meses.

3.2. Coleta de amostras de sêmen e sangue

O sêmen (1-2 mL) de cada animal foi coletado por vagina artificial modelo curto, na presença de fêmeas em estro. Para cada grupo experimental de caprinos machos foi utilizada uma fêmea negativa para o CAEV. As fêmeas foram monitoradas mensalmente por IDGA e PCR, para avaliação da ausência de infecção. As coletas foram realizadas semanalmente, durante 12 meses. A cada coleta de sêmen era realizada a coleta de duas amostras de sangue distintas de cada animal. As

amostras de sangue foram obtidas por venopunção da veia jugular, utilizando-se tubos a vácuo (4 mL) com anticoagulante (EDTA 10µl/mL de sangue) para pesquisa da presença do vírus no sangue por PCR e outra sem anticoagulante, para pesquisa de anticorpos no soro por IDGA. Imediatamente após o final da coleta, as amostras eram encaminhadas à Escola de Veterinária da UFMG (EV-UFMG) para serem testadas por PCR (sangue e sêmen) no Laboratório de Retrovirologia Animal (Retrolab) e por IDGA (soro) no Laboratório de Sanidade de Ovinos e Caprinos (LASOC).

3.3. Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

As amostras de soro de cada animal foram testadas por IDGA frente a antígeno comercial (Kit IDGA-CAE, Biovetech, PE, Brasil) para detecção de anticorpos anti-p28 e gp135. Foram utilizados 20 µL de soro/antígeno, aplicados em gel de agarose a 1% em tampão de base borato. A leitura dos testes foi realizada em luz indireta sobre fundo escuro, em intervalos de 24, 48 e 72 horas após a aplicação dos soros teste e controle, sendo considerada definitiva a última leitura (Gouveia *et al.*, 2000).

3.4. Extração do DNA pró-viral a partir de amostras de sangue

Para a PCR utilizou-se as células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que foram obtidas pela centrifugação em gradiente de densidade. As amostras de sangue em EDTA foram centrifugadas a 400 x g por 10 min à temperatura ambiente (25°C). Após centrifugação, a camada formada pelos leucócitos foi retirada por pipetagem e diluída em 1 mL de PBS (0,01M PO₄, 0,15M NaCl, pH 7,2). Esta camada foi vertida sobre 4 mL de Histopaque (densidade 1,077, Sigma, São Paulo, Brasil) e centrifugado por 30 min a 500 x g. As células da interfase, composta por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram recuperadas e lavadas por duas vezes em PBS, para posterior extração do DNA obtida com Kit de extração de ácidos nucleicos (*Biosystems*, PR, Brasil) de acordo com as

recomendações do fabricante, e quantificadas por espectrofotometria.

3.5. Extração do DNA pró-viral a partir de amostras de sêmen

Para extração do DNA pró-viral as amostras de sêmen foram filtradas, individualmente, em coluna de Sephacryl S-400¹, segundo Santurde *et al.* (1996) e em seguida, foram incubadas a 56°C por 45 min em solução contendo 200µl de Chelex 100² a 5%, 2µL de proteinase K³ (10 mg/mL) e 7µL de DTT 1M. Após centrifugação por 10 s a 700 x g os tubos foram colocados em banho de água fervente por 8 min e em seguida foram centrifugados por três minutos a 700 x g (Walsh *et al.*, 1991). O material foi acondicionado em geladeira até sua utilização na prova de PCR.

3.6. Reação em cadeia pela polimerase (PCR *nested*)

Controles positivo e negativo foram preparados a partir de monocamadas de células de MSC sendo ou não inoculadas com amostra do CAEV Cork de referência. As suspensões celulares foram obtidas por tripsinização das monocamadas. Depois de centrifugadas (400 x g por 10 min) e submetidas a duas lavagens com 10 mL de PBS (0,01M PO₄, 0,15M NaCl, pH 7,2), as células foram ressuspensas em tampão hipertônico (0,32M sacarose; 10mM Trizma hydrochloride, pH 7,5; 5,0mM MgCl₂; 1,0% Triton X 100), para lise do citoplasma durante alguns minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado (400 x g por 10 min), sendo o sedimento lavado com PBS (0,01M PO₄, 0,15M NaCl, pH 7,2) e ressuspensado em 250 µL de tampão de PCR (10mM Tris.HCl, pH 8,0; 50mM KCl; 1,0mM MgCl₂; 5% glicerol; 0,05% Tween 20) e tratado com 100µg de proteinase K/mL, durante 60 min a 56°C. Finalmente a proteinase K foi inativada termicamente (100°C por 10 min) e as amostras acondicionadas em geladeira e, posteriormente em congelador a -20°C.

¹ Pharmacia, Uppsala, Sweden

² Sigma, EUA C- 7901

³ Gibco / BRL, EUA

Foram utilizados dois pares de iniciadores derivados a partir das seqüências das regiões *gag* da amostra padrão CAEV-Cork (Saltarelli *et al.*, 1990). A reação de PCR *nested* foi realizada segundo metodologia de Barlough *et al.* (1994), com algumas modificações, para a região *gag*. Foram utilizados os iniciadores externos GAG1 (5' - CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3', nucleotídeos 953 à 975) e GAG2 (5' - TCCTACCCCAATAATTTGATCCAC -3', nucleotídeos 1249 à 1226) resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 297 pares de bases (pb). Os iniciadores internos GAG 3 (5' GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' nucleotídeos 997-1024) e GAG4 (5' ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' - nucleotídeos 1181 à 1154) foram utilizados na segunda amplificação, resultando em um fragmento final de 185 pb .

Iniciadores para amplificação do quarto exon do gene da β -actina humana foram utilizados como controle interno da reação, para a avaliação da integridade do DNA das amostras. Os iniciadores externos ES30 (5' - TCATGTTTGAGACCTTCAACACCCAG - 3') e ES32 (5' - CCAGGGGAAGGCTTGAAGAGT GCC -3') foram utilizados no primeiro ciclo, e os iniciadores internos ES31 (5' - CC CAGCCATGTACGTTGCTATCC -3') e ES33 (5' - GCCTCAGGGCAGCGGAACCGCTCA - 3') foram utilizados no segundo ciclo de amplificação (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008).

Na primeira amplificação, 5 μ L de DNA (contendo 0.5–1 μ g) foram adicionados a 45 μ L de solução de amplificação, ou “mix1” contendo: 5 μ L de tampão de reação 10x (670 mM Tris/HCl (pH 8.8), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween-20), 1,5 μ L of MgCl₂ (50 mM), 1,0 μ L de dNTP (25 mM de cada: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,2 μ L de TAQ polimerase (5 U/mL, TAQ platinum, Invitrogen/São Paulo , Brasil), 1,5 μ L de cada iniciador GAG EX3, GAG EX5, ES30 e ES32 (20 mM) e 31,3 μ L de água ultra pura.

Para a segunda amplificação, 1 μ L da primeira reação foi adicionado a 49 μ L da segunda solução, ou “mix2” contendo os mesmos reagentes da solução 1, exceto que, os iniciadores externos GAG IN1,

GAGIN2, ES31 e ES33 foram substituídos pelos iniciadores internos GAGEX3, GAGEX4, ES30 e ES32.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador⁴, no qual cada amostra foi submetida ao ciclo inicial de desnaturação das fitas de DNA (94°C por 3 min). Após a primeira fase de desnaturação, cada amostra foi submetida a uma série de 35 ciclos que consistiam em uma fase adicional de desnaturação (94°C por 30 s), seguida de hibridização (56°C por 30 s), e uma fase de extensão (72°C por 30 s). Cada amplificação foi seguida de uma fase de extensão final a 72°C por 7 min.

3.7 - Eletroforese

As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, juntamente com o marcador molecular (100 bp⁵), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,2% em TBE (89 mM Tris, 89 mM borato e 2 mM EDTA, pH 8,3), corado com brometo de etídio adicionado ao gel (0,5 μ g/mL). Cada amostra (10 μ L) juntamente com 2 μ L de tampão de corrida foram submetidas a eletroforese em cuba horizontal, com TBE (89 mM Tris, 89 mM borato e 2 mM EDTA, pH 8,3), por 1 h e 30 min. A visualização das bandas de DNA foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta e registradas fotograficamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a PCR *nested*, foram detectadas bandas de 185 pb que correspondem ao DNA proviral de CAEV em amostras de sêmen (Fig. 1) *in natura* e sangue (Fig. 2) dos reprodutores infectados. Este resultado demonstra o risco de transmissão do CAEV pelo sêmen, evidenciando a importância de um controle rigoroso quanto à condição sanitária do sêmen caprino comercializado pelas centrais de inseminação artificial e à

⁴ Programmable Thermal Controller, PTC-100, MJ Research, Inc, EUA

⁵ 100bp DNA Ladder, Gibco /BRL, EUA

importação de animais de países endêmicos.

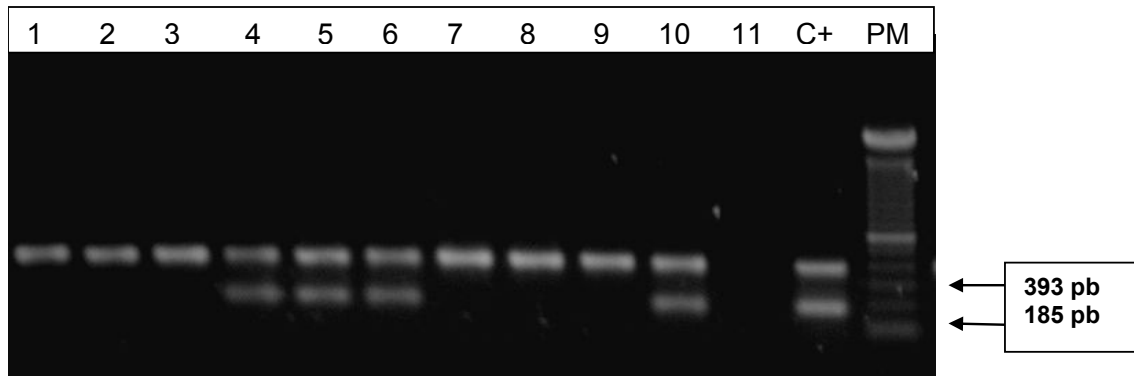


Figura 1 - Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. PCR *nested* de amostras de sêmen de caprinos infectados com o CAEV, bandas de 185 pb. Controle interno (β -actina endógena), bandas de 393 pb. **PM**: marcador 100 bp DNA ladder; **C+**: controle positivo; **canaleta 1**: amostra animal controle negativo; **canaletas 2, 3, 7, 8, 9**: amostras negativas; **canaletas 4, 5, 6 e 10**: amostras positivas; **canaleta 11**: água.

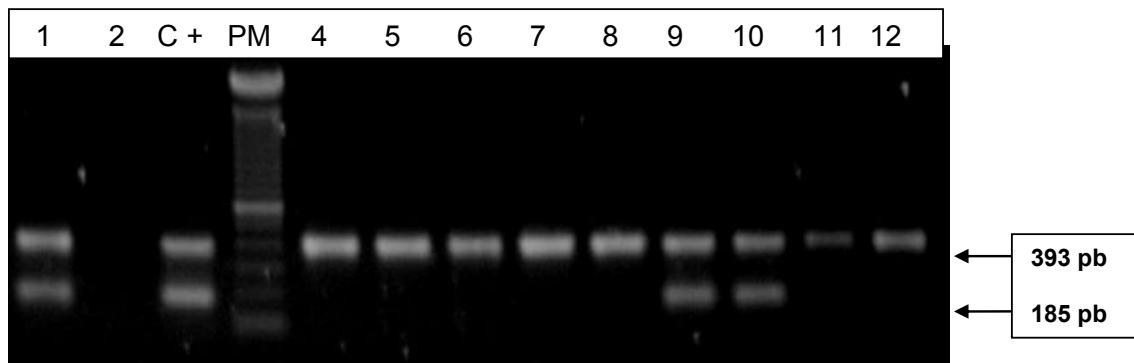


Figura 2 - Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo. PCR *nested* de amostras de sangue de caprinos infectados com o CAEV, bandas de 185 pb. Controle interno (β -actina endógena), bandas de 393 pb. **PM**: marcador 100 bp DNA ladder; **canaleta 2**: água; **C+**: controle positivo; **canaleta 1, 9, 10**: amostras positivas; **canaletas 4, 5, 6, 7 e 8**: amostras negativas; **canaleta 11**: controle negativo **canaleta 12**: amostra animal controle negativo.

No quadro 1 estão apresentados os resultados da IDGA e PCR durante todo o período do experimento.

Quadro 1 - Infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) detectada pela presença (+) ou ausência (-) de anticorpos precipitantes (IDGA), ou DNA pró-viral (PCR) no sangue e sêmen de caprinos infectados, em amostras coletadas periodicamente durante 12 meses.

Animal	Amostra	Grupo	Dias pós infecção																					
			1	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	265	280	320	365	
1	soro	C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
	sêmen		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	sangue		+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
2	soro	A	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
	sêmen		-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	sangue		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3	soro	A	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	
	sêmen		-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
	sangue		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
4	soro	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	†	†	†	†	
	sêmen		-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	†	†	†	†	
	sangue		-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	†	†	†	†
5	soro	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	sêmen		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
	sangue		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	soro	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	
	sêmen		-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	sangue		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
7	soro	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
	sêmen		-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	sangue		-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
8	soro	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
	sêmen		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	sangue		-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
9	soro	B	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
	sêmen		-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	sangue		-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	soro	B	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	sêmen		-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	sangue		-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+

C – aturalmente infectado, A – Grupo com infecção experimental com CAEV amostra de campo, B – grupo com Infecção experimental com amostra padrão CAEV Cork, † - Morte

Os resultados dos testes sorológicos (IDGA) e de PCR de sangue e sêmen dos animais dos três grupos experimentais (A, B e C) foram consolidados na Tabela 1, de forma a favorecer a análise comparativa dos resultados individuais. Os animais do grupo

controle apresentaram resultados negativos em todas as amostras (sangue, soro e sêmen) e testes (IDGA e PCR) durante todo o período de estudo (12 meses) e não foram descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Primodeteção pós-infecção em sangue e sêmen (PCR-nested) e da soroconversão (IDGA) de caprinos infectados com CAEV amostra de campo (animais 2-5, grupo A e animal 1, grupo C) e amostra padrão Cork (animais 6-10, grupo B)

Primodeteção em dias				
Animal	Grupo	IDGA soro	PCR sangue	PCR sêmen
1	C	1d	1d	150d
2	A	45d	60d	45d
3	A	60d	90d	60d
4	A	150d	60d	15d
5	A	-	-	105d
6	B	180d	165d	30d
7	B	240d	60d	45d
8	B	60d	75d	195d
9	B	60d	60d	15d
10	B	120d	90d	90d
Média		91d	66d	75d

4.1. Soroconversão e perfil sorológico pós-infecção

A soroconversão e o perfil sorológico dos machos caprinos foram monitorados por IDGA em amostras de soro semanais durante 12 meses (Quadro 1); ao final deste período, 90% (9/10) dos animais (Tabela 1) tornaram-se soropositivos, mas não apresentaram um padrão na soroconversão, ao contrário, observou-se grande variação individual (Tabela 1). O animal 1 (naturalmente infectado) produziu anticorpos em níveis detectáveis por IDGA durante todo o período, salvo alguns poucos episódios (105, 150 e 225 dias pós infecção,

Quadro 1). Técnicas sorológicas mais sensíveis, como o ELISA, são indicadas para fases mais avançadas de programas de controle de LVPR, sendo úteis para identificação de indivíduos falso negativos por IDGA, os quais são epidemiologicamente importantes na manutenção de níveis basais de infecção em rebanhos controlados. É provável que na infecção natural ocorram ativações periódicas do vírus e circulação das variantes virais entre os animais, e os títulos tornem-se mais homogêneos e elevados.

No animal 2, os níveis de anticorpos foram suficientes para a detecção contínua

durante os 12 meses experimentais (Quadro 1 e Tabela 1). A soroconversão ocorreu dentro do período esperado pela literatura, entre quatro a oito semanas. Padrão semelhante, foi descrito por Adams *et al.* (1980), que observaram após a soroconversão que os níveis de anticorpos contra o CAEV se elevaram até alcançarem um limiar, declinando em seguida até a estabilização. Nos demais indivíduos (Tabela 1), ficou caracterizada a ocorrência de soroconversão tardia, observada em maior amplitude no animal 5 (Quadro 1), não sendo a infecção detectada pela sorologia até o período proposto de monitoramento do estudo.

A soroconversão tardia tem sido observada em outras espécies infectadas pelos lentivírus. Macacos (*Sooty Mangabey Monkeys*) podem portar o vírus da imunodeficiência símia indefinidamente sem soroconverterem. O mesmo foi observado com o vírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos e com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) em humanos (Rimstad *et al.*, 1993). Em caprinos, estudos anteriores descrevem respostas intermitentes de anticorpos, medidas pela IDGA, ELISA ou WB (Mackenzie *et al.*, 1987; Rowe *et al.*, 1992; Rimstad *et al.*, 1993; Castro *et al.*, 2002). A soroconversão tardia pode ocorrer pela lenta produção de anticorpos, não permitindo a detecção do CAEV pelos testes sorológicos após meses ou anos da primoinfecção (Brodie *et al.*, 1995).

A menor frequência de resultados positivos por IDGA após a soroconversão em alguns indivíduos pode ter ocorrido pela variação no título de anticorpos, o estado fisiológico do hospedeiro e a possível interferência dos diferentes genótipos dos animais e/ou das amostras virais empregadas no estudo.

A IDGA possui sensibilidade analítica baixa, necessitando de uma concentração de anticorpos em torno de 30 µg/mL, para que os mesmos possam ser detectados (Frota *et al.*, 2005). Wagter *et al.* (1998) afirmam que a produção de anticorpos em níveis detectáveis por IDGA é demorada, podendo

ocorrer até 18 meses após a detecção por PCR ou até mesmo não acontecer.

Rimstad *et al.* (1993) demonstraram que a soroconversão tardia acontece, mesmo utilizando testes com sensibilidade analítica superiores ao da IDGA, como os testes imunoenzimáticos. Esses autores observaram soroconversão com até oito meses de acompanhamento dos animais e afirmam que a soroconversão tardia é uma característica da infecção pelo CAEV com implicações diretas no controle desta enfermidade.

No entanto, o baixo custo e a alta praticidade do teste, tornam a IDGA uma ferramenta importante nas fases iniciais e intermediárias de programas de controle da CAE (Pinheiro *et al.*, 2005; 2006). As informações geradas neste estudo sugerem que os resultados obtidos por IDGA isoladamente, sejam interpretados com cautela, principalmente na seleção de animais a serem adquiridos pelas centrais de IA ou por rebanhos livres do CAEV.

4.2. DNA pró-viral do CAEV no sangue e sêmen

Os resultados apresentados no quadro 1 e na tabela 1 demonstram que o CAEV (DNA pró-viral) foi eliminado de maneira intermitente no sêmen de todos os animais infectados e que em 90% (9/10) deles, a infecção foi também detectada no soro (IDGA) e por PCR do sangue (DNA pró-viral). Andrioli *et al.* (1999) também encontraram variação na detecção do CAEV em amostras de sêmen lavado e não lavado em reprodutores infectados pelo CAEV submetidos ou não à lesão testicular. A presença do CAEV foi mais frequente nas amostras de sêmen não lavado e após lesão testicular.

Jordan *et al.* (1995) observaram que a presença do vírus da imunodeficiência felina no ejaculado de gatos domésticos variou tanto entre animais quanto nos vários ejaculados do mesmo animal. Concha-Bermejillo *et al.* (1996) observaram que a presença do MVV em sêmen de ovinos co-infectados com *Brucella ovis* também não foi

constante. Entretanto, o monitoramento do perfil de eliminação do CAEV no sêmen por um período de 12 meses ainda não havia sido relatado.

No sangue, o CAEV se encontra associado aos monócitos, e uma taxa mínima de replicação viral no hospedeiro é requerida para que o número de células contendo o DNA pró-viral em quantidade suficiente, esteja presente para que ocorra a detecção pela PCR em determinada amostra de sangue. A via de disseminação do CAEV da circulação sanguínea para o sêmen é supostamente mediada pelos macrófagos (Blacklaws *et al.*, 2004).

Ainda no quadro 1 e na tabela 1, observa-se que foram raros os episódios em que a presença do DNA pró-viral foi coincidente entre as amostras de sangue e sêmen. Peterson *et al.* (2008) não observaram uma correlação entre o número de monócitos e/ou macrófagos no sangue e sêmen. Quanto à sensibilidade analítica do teste, a PCR identificou as bandas esperadas entre $10^{4,5}$ a $10^{0,5}$ TCDI₅₀/50µl em sobrenadante de cultivo celular inoculado, quando se utilizaram os iniciadores externos. Com a realização da segunda etapa, PCR *nested*, utilizando os iniciadores internos, as bandas esperadas foram obtidas entre $10^{4,5}$ a $10^{-4,5}$ TCDI₅₀/50µl. A PCR *nested* apresentou sensibilidade analítica adequada para identificação da infecção e tem sido utilizada por vários autores para detecção do DNA pró-viral do CAEV (Barlough *et al.*, 1994; Travassos *et al.*, 1998; Andrioli *et al.*, 1999, 2006; Peterson *et al.*, 2008; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008)

A discordância entre os resultados da PCR de sangue e sêmen pode indicar que nestes indivíduos, o pró-vírus detectado no sêmen pode ter se originado em outro compartimento corporal que não o sangue. A presença do DNA pró-viral do CAEV foi detectada pela PCR e hibridização *in situ* em diversos tecidos, entre eles o epidídimo, próstata, ampola e glândula bulbo-uretral (Peterson *et al.*, 2008; Ali Al Ahmad *et al.*, 2008). A presença do vírus em vários tecidos que contribuem para a produção do sêmen pode influenciar na intermitência da

eliminação do CAEV no ejaculado, como foi observado nos animais em nosso estudo. Gupta *et al.* (2000) ao avaliarem o perfil de eliminação viral no sêmen de pacientes portadores do HIV, observaram três padrões de eliminação: pacientes que não eliminavam em nenhum momento, pacientes com eliminação contínua e pacientes classificados como intermitentes.

O padrão de eliminação descontínuo, e talvez uma variedade de reservatórios possíveis no tecido reprodutivo masculino, podem justificar em parte, a ausência da detecção em alguns indivíduos nos diferentes períodos da infecção, observados no presente estudo. No homem, observa-se que as amostras virais presentes no ejaculado, originadas dos tecidos reservatórios do HIV que o produzem, evoluem de forma diferente dos compartimentos sanguíneos ou de outros sítios anatômicos (Zhu *et al.*, 1996).

Dessa forma, o trato genital pode constituir um compartimento viral distinto do sangue, produzindo localmente, partículas virais submetidas a uma pressão de seleção particular. No animal 5 (Quadro 1 e Tabela 1), não foi detectada a presença do CAEV (anticorpos) no soro e sangue (DNA pró-viral) durante todo o período estudado. Entretanto, a presença do CAEV no sêmen foi detectada e ocorreu em padrão intermitente, de forma semelhante aos outros indivíduos.

Este caso (animal 5), demonstra o risco potencial de disseminação do vírus por animais infectados que apresentem soroconversão tardia e/ou resultados negativos na PCR do sangue, principalmente em rebanhos submetidos a programas de controle e/ou erradicação do CAEV. Nestes rebanhos, o descarte contínuo de animais sororeagentes pode provocar uma pressão de seleção para amostras do CAEV que resultem na soroconversão tardia. (Rimstad *et al.*, 1993). Ao mesmo tempo, esses autores ressaltam a importância do teste de amostras de sêmen de reprodutores pretendentes ou já incorporados aos plantéis das centrais de IA, assim como na certificação da ausência

do CAEV nas partidas de sêmen a serem adquiridas para inseminação seja *in vivo* ou *in vitro*.

No caso da importação de sêmen, deve ser considerada, a impossibilidade de acesso a outro tipo de amostra que não as partidas de sêmen, para avaliação da condição sanitária do animal de interesse, reforçando a pertinência da submissão destas amostras a investigação do CAEV pela PCR-*nested*. Devido ao fato de uma pequena proporção de animais apresentarem resultados negativos a PCR, o maior custo e complexidade na execução, quando comparado aos testes sorológicos, provavelmente estes continuarão a serem usados como testes padrões nos programas de controle. Entretanto, o uso de testes diagnósticos sorológicos e moleculares em conjunto apresenta-se como uma opção mais segura na avaliação da condição sanitária dos rebanhos, identificando mais precocemente a infecção em animais portadores da infecção, mas que apresentem soroconversão tardia.

A PCR-*nested* de amostras de sêmen pode auxiliar na identificação de indivíduos infectados pelo CAEV que apresentem sorologia negativa, ou nos casos em que as amostras de sangue e soro não estejam disponíveis para diagnóstico. Além disso, a identificação de alíquotas negativas de sêmen pela PCR-*nested*, oriundas de animais infectados pelo CAEV, é uma alternativa para prolongar a vida útil de reprodutores caprinos de alto valor genético.

6. CONCLUSÕES

O monitoramento sorológico pós infecção pelo CAEV aponta para a ocorrência de soroconversão variando de precoce a tardia, com importante significado epidemiológico.

O perfil sorológico (anticorpos precipitantes) pós infecção com amostras padrão Cork e de campo do CAEV é flutuante.

O DNA pró-viral do CAEV está presente de forma intermitente em monócitos sanguíneos de animais infectados.

O DNA pró-viral do CAEV é eliminado de maneira intermitente no sêmen de animais infectados.

Caprinos que apresentam resultado negativo nos testes de IDGA e PCR de sangue, podem eliminar o CAEV no sêmen.

Resultados negativos ao teste de PCR-*nested* em amostra única de sêmen não garante ausência do CAEV em amostras subsequentes.

A não detecção do DNA-pró-viral em monócitos do sangue ou pelo IDGA não garante uma seleção confiável de animais livres do CAEV no sêmen

A associação dos testes diagnósticos IDGA para detecção de anticorpos precipitantes anti- p24 e gp135 do CAEV, PCR-*nested* de amostras de sangue e, quando for o caso, de amostras de sêmen, é opção mais segura para a certificação da condição sanitária individual ou de rebanho e para a eliminação do CAEV dos rebanhos

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; T. B. CRAWFORD; K. L. BANKS; T. C. MCGUIRE ; L. E. PERRYMAN. Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect. Immun.*, v. 28, n. 2, p. 421-7, 1980.

ADAMS, D. S.; P. KLEVJER-ANDERSON, J. L. CARLSON; T. C. MCGUIRE ; J. R. GORHAM. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, n. 9, p. 1670-5, 1983.

ADAMS, D. S.; R. E. OLIVER; E. AMEGHINO; J. C. DEMARTINI; D. W. VERWOERD; D. J. HOUWERS; S. WAGHELA; J. R. GORHAM; B. HYLLSETH, M. DAWSON; et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Rec.*, v. 115, n. 19, p. 493-5, 1984.

- ALI AL AHMAD, M. Z.; F. FIENI; F. GUIGUEN; M. LARRAT; J. L. PELLERIN; C. ROUX; Y. CHEBLOUNE. Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. *Virology*, v. 353, n. 2, p. 307-15, 2006.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; F. FIENI; L. MARTIGNAT; G. CHATAGNON; G. BARIL; F. BOUVIER; Y. CHEBLOUNE. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. *Theriogenology*, v. 64, n. 7, p. 1656-66, 2005.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; F. FIENI; J. L. PELLERIN; F. GUIGUEN; Y. CHEREL; G. CHATAGNON; A. B. BOUZAR; Y. CHEBLOUNE. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*, v. 69, n. 4, p. 473-80, 2008.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 23, n. 8, p. 420-421, 1999.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. *et al.* Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesq. Agropec. Bras.*, v.41, n.8 p.1313-1319, 2006.
- ANDRIOLI, A. e GOUVEIA, A. M. G. Vírus da Atrite Ecefalite Caprina: PCR e isolamento viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões, 2001, 68p. Doutorado (Ciência Animal) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- ASSIS, A.P.M. e GOUVEIA, A.M.G. Evidência sorológica de lentivírus (Maedi Visna / Artrite Encefalite Caprina) em rebanhos nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Ceará. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Recife. *Anais...Recife*, 1994. p.104.(Resumo).
- BARLOUGH, J.; N. EAST; J. D. ROWE; K. VAN HOOSEAR; E. DEROCK; L. BIGORNIA ; E. RIMSTAD. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods*, v. 50, n. 1-3, p. 101-13, 1994.
- BERRIATUA, E. V.. ALVAREZ, B. EXTRAMIANA, L. GONZALEZ; M. DALTABUIT; R. JUSTE. Transmission and control implications of seroconversion to Maedi-Visna virus in Basque dairy-sheep flocks. *Prev. Vet. Med.*, v. 60, n. 4, p. 265-79, 2003.
- BLACKLAWS, B. A.; E. BERRIATUA; S. TORSTEINSDOTTIR; N. J. WATT; D. DE ANDRES; D. KLEIN; G. D. HARKISS. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, v. 101, n. 3, p. 199-208, 2004.
- BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M., et al. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. *Am. J. Pathol.*, v.146, p.250-263, 1995.
- CALLADO, A. K. C.; R. S. CASTRO; M. F. S. TEIXEIRA. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.
- CASTRO, R.S.; LEITE, R.C.; AZEVEDO, E.O.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A.M.G. Seroconversion and seroreactivity patterns of dairy goats naturally exposed to caprine arthritis-encephalitis virus in Brazil. *Rev. Ciência Rural*, v.32, n.4, p. 603-607. 2002.
- CELER, V. JR.; R. G. ZANONI; E. PETERHANS. Comparison of various antigens in the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus using the ELISA test. *Vet. Med.*, v. 38, n. 4, p. 237-44, 1993.
- CHEBLOUNE, Y.; B. KARR; D. SHEFFER; K. LEUNG; O. NARAYAN. Variations in lentiviral gene expression in monocyte-

- derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.*, v. 77, n.9, p. 2037-51, 1996a.
- CHEBLOUNE, Y.; D. SHEFFER; B. M. KARR; E. STEPHENS; O. NARAYAN. Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology*, v. 222, n. 1, p. 21-30, 1996b.
- CHEEVERS, W. P.; D. P. KNOWLES; T. C. MCGUIRE; D. R. CUNNINGHAM; D. S. ADAMS; J. R. GORHAM. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Lab. Invest.*, v. 58, n. 5, p. 510-7, 1988.
- CHEEVERS, W. P. e T. C. MCGUIRE. The lentiviruses: maedi/visna, caprine arthritis-encephalitis, and equine infectious anemia. *Adv. Virus. Res.*, v. 34, p. 189-215, 1988.
- CHEEVERS, W. P.; T. C. MCGUIRE; L. K. NORTON; R. CORDERY-COTTER; D. P. KNOWLES. Failure of neutralizing antibody to regulate CAE lentivirus expression in vivo. *Virology*, v. 196, n. 2, p. 835-9, 1993.
- CLEMENTS, J. E.; O. NARAYAN; L. C. CORK. Biochemical characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, n. 2, p. 423-7, 1980.
- CORK, L. C.; W. J. HADLOW; T. B. CRAWFORD; J. R. GORHAM; R. C. PIPER. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.*, v. 129, n. 2, p. 134-41, 1974.
- CRAWFORD, T. B. e D. S. ADAMS. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 178, n. 7, p. 713-9, 1981.
- CRAWFORD, T. B.; D. S. ADAMS; W. P. CHEEVERS; L. C. CORK. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v. 207, n. 4434, p. 997-9, 1980.
- DE ANDRES, D.; D. KLEIN; N. J. WATT; E. BERRIATUA, S. TORSTEINSDOTTIR; B. A. BLACKLAWS; G. D. HARKISS. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet. Microbiol.*, v. 107, n. 1-2, p. 49-62, 2005.
- DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.
- DE LA CONCHA-BERMEJILLO A.; S. J. BRODIE; S. MAGNUS-CORRAL; R. A. BOWEN; J. C. DEMARTINI. Pathologic and serologic responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, v. 8, n. 2, p. 116-23, 1995.
- DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; S. MAGNUS-CORRAL; S. J. BRODIE; J. C. DEMARTINI. Venereal shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.*, v. 57, n. 5, p. 684-8, 1996.
- DUS SANTOS, M. J; K. TRONO; I. LAGER ;A. WIGDOROVITZ. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet. Microbiol.*, v. 119, n. 1, p. 10-8, 2007.
- EAST, N. E.; J. D. ROWE; B. R. MADEWELL; K. FLOYD. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 190, n. 2, p. 182-6, 1987.
- FIENI, F.; J. ROWE; K. VAN HOOSEAR; C. BURUCOA; S. OPPENHEIM; G. ANDERSON, J. MURRAY; R. BONDURANT. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology*, v. 59, n. 7, p. 1515-23, 2003.
- FROTA, M.N.L; SILVA, J.B.A.; ARAÚJO, S.A.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Artrite encefalite caprina em cabritos de rebanho com programa de controle no estado do Ceará. *Arq. Inst. Biol.*, v.72, n.2, p.147-152, 2005.
- GOUVEIA, A. M. G. Aspectos sanitários da caprinovinocultura no Brasil. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2003,

João Pessoa, PB Anais... 2003. p. 115-131(Resumo).

GOUVEIA, A.M.G; MELO, L.M; PIRES, L.L; PINHEIRO, R.R. Microimunodifusão em gel de agar para o diagnostico sorológico de infecção por lentivirus de pequenos ruminantes. In CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 27, Águas de Lindóia, SP. Anais... Águas de Lindóia 2000, p.33 (Resumo).

GUPTA, P.; C. LEROUX; B. K. PATTERSON; L. KINGSLEY; C. RINALDO; M. DING; Y. CHEN; K. KULKA; W. BUCHANAN; B. MCKEON; R. MONTELARO. Human immunodeficiency virus type 1 shedding pattern in semen correlates with the compartmentalization of viral Quasi species between blood and semen. *J. Infect. Dis.*, v. 182, n. 1, p. 79-87, 2000.

HANSON, J., E. HYDBRING e K. OLSSON. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Vet. Scand.*, v. 37, n. 1, p. 31-9, 1996.

HARMACHE, A.; C. VITU; F. GUIGUEN; P. RUSSO; G. BERTONI; M. PEPIN; R. VIGNE ; M. SUZAN. Priming with tat-deleted caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) proviral DNA or live virus protects goats from challenge with pathogenic CAEV. *J. Virol.*, v. 72, n. 8, p. 6796-804, 1998.

HOTZEL, I. e W. P. CHEEVERS. Caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein regions interacting with the transmembrane glycoprotein: structural and functional parallels with human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* v. 77, n. 21, p. 11578-87, 2003.

HOUWERS, D. J. e I. M. NAUTA. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet. Microbiol.*, v. 19, n. 2, p. 127-39, 1989.

JORDAN, H. L.; J. HOWARD; W. A. TOMPKINS; S. KENNEDY-STOSKOPF. Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats

(*Felis catus*). *J. Virol.*, v. 69, n. 11, p. 7328-33, 1995.

KLEIN, J. R.; J. MARTIN; S. GRIFFING; N. NATHANSON; J. GORHAM; D. T. SHEN; G. PETURSSON; G. GEORGSSON; P. A. PALSSON; R. LUTLEY. Precipitating antibodies in experimental visna and natural progressive pneumonia of sheep. *Res. Vet. Sci.*, v. 38, n. 2, p. 129-33, 1985.

KNOWLES, D. JR.; W. CHEEVERS; T. MCGUIRE; T. STEM; J. GORHAM. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.*, v. 64, n. 5, p. 2396-8, 1990.

KNOWLES, D. P.; JR., J. F. EVERMANN; C. SHROPSHIRE; J. VANDERSCHALIE; D. BRADWAY; H. M. GEZON; W. P. CHEEVERS. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, n. 1, p. 243-5, 1994.

LE TORTOREC, A. e N. DEJUCQ-RAINSFORD. The male genital tract: A host for HIV. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, v. 35, n. 12, p. 1245-50, 2007.

LEGASTELOIS, I.; G. CORDIER; G. COZON; J. L. CADORE; F. GUIGUEN; T. GREENLAND; J. F. MORNEX. Visna-maedi virus-induced expression of interleukin-8 gene in sheep alveolar cells following experimental in vitro and in vivo infection. *Res. Virol.*, v. 147, n. 2-3, p. 191-7, 1996.

LEITNER, G.; O. KRIFUCKS; L. WEISBLIT; Y. LAVI; S. BERNSTEIN; U. MERIN. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. *Vet. J.*, v., n., p., 2009.

LEROUX, C.; C. LERONDELLE, J.; CHASTANG; J. F. MORNEX. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet. Res.*, v. 28, n. 2, p. 115-21, 1997.

- MACKENZIE, R. W., R. E. OLIVER, J. P. ROONEY e H. KAGEI. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *N Z Vet J*, v. 35, n. 11, p. 184-6, 1987.
- MODOLO, J. R., C. R. STACCHISSINI, C. R. PADOVANI, J. P. ARAÚJO JÚNIOR, R. S. CASTRO, A. P. RAVAZZOLO e B. L. S. LEITE. PCR associated with agar gel immunodiffusion assay improve caprine arthritis-encephalitis (CAEV) control. *Small Rumin. Res.*, v. 81, p. 18-20, 2009.
- MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZZOLO, A.P. *et al.* Evidência de infecção pelo lentivirus (maedi-visna/artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS*, v. 14, p.77-78, 1986.
- NAKAGAWA, M.; Y. MOTOI; M. IIZUKA; R. AZUMA. Histopathology of enzootic chronic polyarthritis of goats in Japan. *Natl. Inst. Anim. Health Q (Tokyo)*, v. 11, n. 4, p. 191-200, 1971.
- NARAYAN, O.; J. E. CLEMENTS; J. D. STRANDBERG; L. C. CORK; D. E. GRIFFIN. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, v. 50, n. 1, p. 69-79, 1980.
- NARAYAN, O. e L. C. CORK. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev. Infect. Dis.*, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.
- NENCI, C.; M. L. ZAHNO; H. R. VOGT; G. OBEXER-RUFF; M. G. DOHERR; R. ZANONI; E. PETERHANS; G. BERTONI. Vaccination with a T-cell-priming Gag peptide of caprine arthritis encephalitis virus enhances virus replication transiently in vivo. *J. Gen. Virol.*, v. 88, n. 5, p. 1589-93, 2007.
- NUOTIO, L.; H. RUSANEN; L. SIHVONEN; E. NEUVONEN. Eradication of enzootic bovine leukosis from Finland. *Prev. Vet. Med.*, v. 59, n. 1-2, p. 43-9, 2003.
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 5 ed. Paris: OIE, 1178p., 2004.
- PERK, K. Presence of virus particles in neural cells of goats with caprine arthritis encephalitis. *Res. Vet. Sci.*, v. 49, n. 3, p. 367-9, 1990.
- PETERHANS, E.; T. GREENLAND; J. BADIOLA; G. HARKISS; G. BERTONI; B. AMORENA; M. ELIASZEWICZ; R. A. JUSTE; R. KRASSNIG; J. P. LAFONT; P. LENIHAN; G. PETURSSON; G. PRITCHARD; J. THORLEY; C. VITU, J. F. MORNEX; M. PEPIN. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet. Res.*, v. 35, n. 3, p. 257-74, 2004.
- PETERSON, K.; J. BRINKHOF; D. J. HOUWERS; B. COLENBRANDER; B. M. GADELLA. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*, v. 69, n. 4, p. 433-42, 2008.
- PHELPS, S. L. e M. C. SMITH. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 203, n. 12, p. 1663-6, 1993.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, AMG; TORRES, AMC; ANDRIOLI, A ; ALVES ,FSF. Custo de produção dos antígenos e dos testes (MIDGA, ELISA indireto, *Dot-Blot*) para o diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 27, p. 32-38, 2005.
- PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G.; ARAÚJO, S.C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento do dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina. *Rev. Port. de Ciências Vet.*, v.101, n.557, p. 51-56, 2006.
- RAJYA, B. S. e C. M. SINGH. The Pathology of Pneumonia and Associated Respiratory Disease of Sheep and Goats. I. Occurrence of Jagziekte and Maedi in Sheep and Goats in India. *Am. J. Vet. Res.*, v. 25, n., p. 61-7, 1964.

- REDDY, P. G.; W. J. SAPP; W. HENEINE. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 31, n. 11, p. 3042-3, 1993.
- REINA, R.; E. BERRIATUA; L. LUJAN; R. JUSTE; A. SANCHEZ; D. DE ANDRES; B. AMORENA. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet. J.*, v. 182, n. 1, p. 31-7, 2009.
- RIMSTAD, E., N. EAST, E. DEROCK, J. HIGGINS e N. C. PEDERSEN. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. *Arch. Virol.*, v. 134, n. 3, p. 345-56, 1994.
- RIMSTAD, E.; N. E. EAST; M. TORTEN; J. HIGGINS; E. DEROCK; N. C. PEDERSEN. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, n. 11, p. 1858-62, 1993.
- ROWE, J. D. e N. E. EAST. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.*, v. 13, n. 1, p. 35-53, 1997.
- ROWE, J. D.; N. E. EAST; M. C. THURMOND; C. E. FRANTI; N. C. PEDERSEN. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 12, p. 2386-95, 1992.
- SALTARELLI, M.; G. QUERAT; D. A. KONINGS; R. VIGNE; J. E. CLEMENTS. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v. 179, n. 1, p. 347-64, 1990.
- SANTURDE, G.; DA SILVA, N.; VILLARES, R. *et al.* Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet. Microbiol.*, v.49, n.1, p.81-92, 1996.
- SAMAN, E.; G. VAN EYNDE; L. LUJAN; B. EXTRAMIANA; G. HARKISS; F. TOLARI; L. GONZALEZ; B. AMORENA; N. WATT; J. BADIOLA. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v. 6, n. 5, p. 734-40, 1999.
- SHAH, C.; J. B. HUDER; J. BONI; M. SCHONMANN; J. MUHLHERR; H. LUTZ; J. SCHUPBACH. Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J. Virol.*, v. 78, n. 14, p. 7518-22, 2004.
- SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. *Goat medicine*. Philadelphia: Lea & Febiger, 620p.,1994.
- STÜNZI, H.; H. F. BÜCH; H. L. LE ROY; W. LEEMANN. Endemische arthritis chronica bei Ziege. *Schweizer. Archiv. fürur Tierärkunden*, v. 106, n., p. 778-788, 1964.
- THOMAR, H. Maedi-visna virus and its relationship to human immunodeficiency virus. *AIDS Rev.*, v.7, p. 233-245, 2005.
- TRAVASSOS, C.; C. BENOIT; S. VALAS; A. DA SILVA; G. PERRIN. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. *Vet. Res.*, v. 29, n. 6, p. 579-84, 1998.
- WAGTER, L.H.A.; JANSEN, A.; BLEUMINK-PLUYM, J.A.; LENSTRA, L.A.; HOUWERS, D.J. PCR detection of lentiviral gag segmente in white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Comm.*, v.22, p. 355-362, 1998.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR-based typing from foresinc material. *Biotechniques*, v.10, p.506-513, 1991.
- WEINHOLD, E. Visna virus-like particles in cultures of choroid plexus cells of a goat with symptoms of Visna infection. *Zentralbl Veterinarmed B*, v. 21, n. 1, p. 32-6, 1974.
- WILKERSON, M. J.; W. C. DAVIS; T. V. BASZLER; W. P. CHEEVERS. Immunopathology of chronic lentivirus-

induced arthritis. *Am. J. Pathol.*, v. 146, n. 6, p. 1433-43, 1995.

YORINORI, E.H ; PINHEIRO, R. R. ; GOUVEIA, A. M. G. ; COURA, MABN ; Haddad, JPA . Estudo Soroepidemiológico da Artrite-Encefalite Caprina nas Regiões Norte e Nordeste de Minas Gerais.. *Revista Universidade Rural. Série Ciências da Vida*, v. 23, p. 259-260, 2003.

ZANONI, R.; U. PAULI; E. PETERHANS. Detection of caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna viruses using the polymerase chain reaction. *Experientia*, v. 46, n. 3, p. 316-9, 1990.

ZHANG, Z., J. GUO, Y. NI, F. W. BAZER, L. GIAVEDONI; A. DE LA CONCHA-BERMEJILLO. Construction and characterization of a recombinant ovine lentivirus carrying the optimized green fluorescent protein gene at the dUTPase

locus. *Arch. Virol.*, v. 148, n. 8, p. 1485-506, 2003.

ZINK, M. C.; O. NARAYAN; P. G. KENNEDY ; J. E. CLEMENTS. Pathogenesis of visna/maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 15, n. 1-2, p. 167-80, 1987.

ZHU, T.; WANG, N.; CARR, A.; NAM, D.S.; MOOR JANKOWSKI, R.; COOPER, D.A. *et al.* Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J. Virol.*, v. 70, p.3098-3107, 1996.