MARJORIE YUMI HASEGAWA

Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite
caprina através do sêmen e da placenta

São Paulo

2014

MARJORIE YUMI HASEGAWA

**Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite
caprina através do sêmen e da placenta**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Lilian Gregory

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3024
FMVZ

Hasegawa, Marjorie Yumi
Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite caprina através do sêmen
e da placenta / Marjorie Yumi Hasegawa. -- 2014.
124 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Gregory.

1. Lentivirus caprino. 2. Transmissão. 3. IDGA. 4. cELISA. 5. Nested-PCR. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite caprina através do sêmen e da placenta", protocolado sob o nº 2285/2011, utilizando 15 (quinze) caprinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Lilian Gregory, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Study of the transmissibility of Caprine Arthritis Encephalitis virus by semen and placenta", protocol number 2285/2011, utilizing 15 (fifteen) caprine, under the responsibility Profa. Dra. Lilian Gregory, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: HASEGAWA, Marjorie Yumi

Título: Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite caprina através do sêmen e da placenta

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esse trabalho à minha família com muito amor e gratidão

Ao meu pai Vatti

Às minhas mães Dalila e Godi

Ao meu companheiro Torres

Aos meus irmãos Paulo e Juliana

Ao meu cunhado Marcelo

E que seja um exemplo para meus queridos sobrinhos,

João Paulo, Lucas e Nicole

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Lilian Gregory, que dedicou seu tempo, compartilhou sua experiência, depositou sua confiança a mim e ajudou a superar os desafios para que meu doutorado fosse também um aprendizado de vida, meu carinho e meu agradecimento, serei eternamente grata.

Ao Torres, pelo carinho e apoio sempre presentes principalmente nos momentos mais difíceis.

À toda equipe LG: Natália Gaeta, Rodolfo Rossi, Bruno Mendonça, Dudu Marques, Enoch Meira Jr, Eriky Tongu, Mika Hayashi, Júlia Marques, Laiz Shirayama, Mayumi Watanabe, Daniela Inácio, Ana Paula Fujita, João Conti Jr, Ivy Gomes, Juliana Gildo, Tatiane Rosa, Arthur, Mariane Franco e Cheiza Cardoso pela ajuda imprescindível que vocês me deram nessa jornada, com muitas noites mal dormidas no ruminantes, de cuidados com os animais, de fins de semana e feriados perdidos, que me acompanharam, choraram, riram, sentiram, participaram, aconselharam, dividiram as suas companhias, os seus sorrisos, as suas palavras, que presenciaram e respeitaram o meu silêncio; que partilharam este longo passar de anos, que ouviram os meus desabafos. As alegrias de hoje também são suas, pois seus estímulos e carinhos foram armas para essa minha vitória.

À Dr^a Maria do Carmo Custódio de Souza Hunold Lara com quem iniciei meu primeiro trabalho durante a graduação, pela amizade, confiança e incentivo, oportunidades de aprendizado e crescimento em minha profissão.

Ao Prof. Dr. Roberto Soares Castro pela cooperação, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Edison Luiz Durigon pelas oportunidades de aprendizado, confiança e amizade.

À Dr^a Eliana Monteforte Cassaro Villalobos pela amizade, apoio e incentivo.

Agradeço também a todos os professores da FMVZ-USP em especial do Departamento de Clínica Médica, Dr. Enrico Lippi Ortolani, Dr. Fernando José Benesi, Dr^a Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Dr^a Maria Claudia Araripe Sucupira, Dr. Fabio Celidonio Pogliani, Dr^a Viviani Gomes, Dr^a Mitika Kuribayashi Hagiwara, Dr. Carlos Eduardo Larsson, Dr. Wilson Roberto Fernandes, Dr^a Maria

Helena Matiko Akao Larsson, Dr^a Márcia Mery Kogika, Dr^a Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Dr^a Silvia Regina Ricci Lucas, Dr. Archivaldo Reche Junior, Dr^a Denise Saretta Schwartz, Dr^a Carla Bargi Belli e Dr^a Lilian Emy dos Santos Michima, pelos ensinamentos recebidos, pelos exemplos de dedicação, profissionalismo e idealismo.

À Prof^a Dr^a Eneiva Carla Carvalho Celeghini pela paciência e cooperação nos ensinamentos de avaliação espermática e no empréstimo de equipamentos necessários para a realização da inseminação artificial.

Ao pessoal dos laboratórios do Departamento de Clínica Médica, Samantha Miyashiro, Cláudia Stricagnolo, Clara Mori, Marly Castro, Maria Luisa Franchini, Maria Helena Pelissari, Dinha e Carmen, pela paciência, cooperação e amizade sempre presentes durante o processamento das amostras e execução dos testes diagnósticos.

Aos (ex) residentes do Serviço de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, Ronaldo Gargano, Loraine Fernandes, Juliana Bombardelli, Gabriela Reis, Bruno Mendonça, Marcela Romanini, Camila Martin e Rodrigo Malzoni pela valiosa ajuda, convivência e amizade e aos estagiários da turma 78 que participaram nos cuidados dos cabritos.

Ao Júlio Spagnolo, médico veterinário do Serviço de Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, pela paciência e cooperação nos procedimentos cirúrgicos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias pela paciência e auxílio na análise estatística.

Às secretárias do Departamento de Clínica Médica, Adelaide Borges, Cida Freitas, Carol Aroma e Silvana Rossi pela alegre convivência e carinho.

Aos funcionários do Serviço de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, Edson, Francisco, Luisinho, Duque e Tita pelo convívio, amizade e ajuda no trato dos animais.

Aos colegas de pós-graduação, em especial Carolina Araújo, Sylvia Novo, Ronaldo Gargano, Caroline Seino, Cynthia Costa, Camila Batista, Renata Caminha, Camila Costa, Heloísa Bertagnon, Kamila Reis, Aline Morgado, Rejane Sousa, Leonardo Barreira, Carolina Shecaira, Rogério Santos, Juliana Bombardelli, Fábio Sellera, Vanessa Storillo, Leandro Lipinski, Melina Yasuoka, Bruna Barbosa, Priscila

Nascimento, Vinicius Baldacim, Giancarlo Bonagura, Giovana Nunes, Alessandra Nassar, Fred Mazzocca e Isadora Sousa, pelo convívio, apoio e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice pelo profissionalismo e cordial atendimento.

Ao Sr. Vicente Ribeiro do Capril São Paulo pela cooperação.

Aos colegas de trabalho da SUVIS Campo Limpo, em especial o setor de Vigilância Sanitária pelo apoio e compreensão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa de doutorado concedida (2011/00773-4), assim como pelo auxílio projeto concedido (2011/00746-7), de fundamental importância para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de doutorado concedida (Cota Institucional).

À todos que direta ou indiretamente de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

E principalmente a todos os caprinos, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

*“Quando uma criatura humana desperta
para um grande sonho e sobre ele
lança toda a força de sua alma,
todo o universo conspira a seu favor.”*

Johann Wolfgang Von Goethe

RESUMO

HASEGAWA, M. Y. **Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite caprina através do sêmen e da placenta.** [Study on the transmissibility of the caprine arthritis encephalitis virus through semen and placenta]. 2014. 124 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Artrite Encefalite Caprina é uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, causada pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina, que pertence dentre os Lentivírus de Pequenos Ruminantes. Sobre o aspecto reprodutivo na transmissão, o objetivo do presente estudo consiste em avaliar experimentalmente a transmissibilidade do lentivírus caprino em cabras e suas crias pela placenta e sêmen. Para avaliar a influência da transmissão via placentária, foram utilizadas cinco fêmeas com CAEV inseminadas artificialmente com sêmen de bode livre de CAEV. Para avaliar a influência da transmissão pelo sêmen, foram utilizadas seis fêmeas livres de CAEV inseminadas artificialmente com sêmen de bode livre de CAEV. O CAEV-Cork foi adicionado ao sêmen fresco com a finalidade de se obter título infectante com carga viral em 10^5 TCID₅₀/mL. Como grupo controle, duas cabras livres de CAEV foram inseminadas artificialmente com sêmen de mesmo bode sem o inóculo viral; e outras duas cabras com CAEV inseminadas com a carga viral. As fêmeas foram monitoradas durante a gestação até 15 dias pós-parto e as crias separadas das mães foram monitoradas até 12 meses de idade, empregando-se as técnicas de IDGA, cELISA e nested-PCR. As fêmeas com CAEV apresentaram resultados positivos em IDGA (87,10%), cELISA (88,71%) e nested-PCR (25,81%). As crias apresentaram resultados negativos em ambos os testes de IDGA e cELISA, embora na técnica de nested-PCR, 7,14% das amostras apresentaram banda positiva. Das seis fêmeas livres de CAEV, quatro (66,67%) apresentaram soroconversão com 18,46% das amostras positivas ao IDGA, 49,23% das amostras positivas ao cELISA e nenhuma para nested-PCR. Anticorpos anti-CAEV foram detectados 30 dias pós IA. Quanto às crias, 5,26% e 11,28% das amostras apresentaram resultado positivo para IDGA e nested-PCR, respectivamente. Nenhuma amostra apresentou positividade para cELISA. O grupo controle livre de CAEV tiveram resultados negativos para as três técnicas, incluindo suas crias; enquanto que as fêmeas com CAEV inseminadas com o inóculo viral apresentaram 61,90% das amostras positivas

para IDGA, 100% para cELISA e nenhuma amostra para nested-PCR. Suas crias obtiveram no total somente um resultado positivo para IDGA e outro para nested-PCR. A positividade encontrada em nested-PCR nas crias pode ter um significado particular de identificar animais infectados porém soronegativos, como em situações de soroconversão tardia. Entretanto, não é possível assumir a transmissão do CAEV para crias de forma insofismável, embora não é descartada a possibilidade de infecção das crias pelo sêmen e placenta com soroconversão tardia. Contudo é possível a transmissão do CAEV por IA com sêmen infectado em fêmeas livres de CAEV. A carga viral utilizada no estudo foi capaz de infectar as fêmeas. Com relação aos testes utilizados, o cELISA detectou a soroconversão mais cedo que o IDGA. A técnica de nested-PCR falhou em detectar a infecção antes da soroconversão nas fêmeas. Este estudo proporcionou maiores informações sobre a transmissão do lentivírus caprino sob o aspecto reprodutivo, com a utilização de três diferentes métodos diagnósticos.

Palavras-chave: Lentivirus caprino. Transmissão. IDGA. cELISA. Nested-PCR.

ABSTRACT

HASEGAWA, M. Y. **Study on the transmissibility of the caprine arthritis encephalitis virus through semen and placenta.** [Estudo sobre a transmissibilidade do vírus da artrite encefalite caprina através do sêmen e da placenta]. 2014. 124 f. Tese. (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2014.

Caprine Arthritis Encephalitis is an infectious, multisystemic disease caused by Caprine Arthritis Encephalitis virus, which belongs among the Small Ruminant Lentiviruses. Regarding the reproductive behavior in the transmission, the objective of the present study consists of experimentally evaluate the transmissibility of caprine lentivirus in goats and their offspring through the placenta and semen. To evaluate the influence of placental transmission, five CAEV females were artificially inseminated with semen from CAEV-free buck. In order to evaluate the influence of transmission by semen, six CAEV-free females were artificially inseminated with semen from CAEV-free buck. The CAEV-Cork was added to fresh semen to obtain infecting titres for viral load of 10^5 TCID₅₀/mL. As control group, two CAEV-free goats were artificially inseminated with semen from same buck without viral inoculum; and other two CAEV goats inseminated with the viral inoculum. The females were monitored during gestation until 15 days post-partum and the offspring, separated from their mothers, were monitored until 12 months old, using AGID, cELISA and nested-PCR techniques. The CAEV females presented positive results in AGID (87,10%), cELISA (88,71%) and nested-PCR (25,81%). The offspring presented negative results in both AGID and cELISA tests, however in nested-PCR technique, 7,14% of samples presented positive band. From the six CAEV-free females, four (66,67%) seroconverted with 18,46% positive samples at AGID, 49,23% at cELISA and none at nested-PCR. Anti-CAEV antibodies were detected 30 days after AI. Regarding to their offspring, 5,26% and 11,28% of samples presented positive results at AGID and nested-PCR, respectively. No sample was positive at cELISA. The CAEV-free females from control group had negative results at the three techniques, including their offspring; while the CAEV females inseminated with the viral inoculum have shown 61,90% of positive samples at AGID, 100% at cELISA and none at nested-PCR. Their offspring have only one sample positive at AGID and another at nested-PCR. The positivity found in offspring at nested-PCR may have a

particular meaning in identify infected but seronegative animals, as in late seroconversion situations. However it is not possible to assume the CAEV transmission to offspring indisputably, though is not discarded the possibility of infection through semen and placenta in offspring with delayed seroconversion. Nevertheless it is possible the CAEV transmission by AI with infected semen in CAEV-free females. The viral load used in the present study was able to infect the females. Regarding the tests used, the cELISA detected seroconversion earlier than the AGID. The nested-PCR technique failed in detecting the infection before seroconversion in females. This study provided more information about the caprine lentivirus transmission concerning the reproductive aspect, using three different diagnostic methods.

Keywords: Caprine lentivirus. Transmission. AGID. cELISA. Nested-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Organograma dos grupos experimentais do presente estudo.....	55
Gráfico 1 -	Porcentagem de resultados positivos para as provas diagnósticas nas cabras do Grupo 1 durante gestação e puerpério - São Paulo – 2011 a 2012.....	68
Gráfico 2 -	Número de cabritos do Grupo 1 com resultado positivo nas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR durante período de vida – São Paulo – 2012 a 2013.....	70
Gráfico 3 -	Número de fêmeas com resultado positivo nas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR após IA com CAEV – São Paulo – 2012 a 2013.....	72
Gráfico 4 -	Número de cabritos do Grupo 2 com resultado positivo nas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR – São Paulo – 2013 a 2014.....	77
Gráfico 5 -	Número de fêmeas do Grupo Controle 2 com resultado positivo para IDGA, cELISA e nested-PCR durante gestação e puerpério – São Paulo – 2012 a 2013.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo 1 - São Paulo – 2011 a 2013.....	65
Tabela 2 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pela prova de IDGA - São Paulo – 2011 a 2013.....	65
Tabela 3 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pela prova de cELISA - São Paulo – 2011 a 2013.....	66
Tabela 4 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pela prova de nested-PCR - São Paulo – 2011 a 2013.....	66
Tabela 5 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2011 a 2013.....	67
Tabela 6 -	Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo 1 pelas provas de IDGA, ELISA e nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2013.....	68
Tabela 7 -	Resultados das provas de IDGA, cELISA e nested-PCR referentes as 11 fêmeas monitoradas até 210 dias pós-IA com inóculo viral - São Paulo – 2012 a 2013.....	70
Tabela 8 -	Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo 2 - São Paulo – 2012 a 2013.....	73
Tabela 9 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 2 pela prova de IDGA - São Paulo – 2012 a 2013.....	74
Tabela 10 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 2 pela prova de cELISA - São Paulo – 2012 a 2013.....	74
Tabela 11-	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 2 pela prova de nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2013.....	74

Tabela 12-	Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo 2 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2013 a 2014.....	75
Tabela 13 -	Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo Controle 1 - São Paulo – 2011 a 2013.....	78
Tabela 14 -	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo Controle 1 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2011 a 2013.....	78
Tabela 15 -	Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo Controle 1 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2014.....	79
Tabela 16 -	Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo Controle 2 - São Paulo – 2012 a 2013.....	81
Tabela 17-	Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo Controle 2 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2013.....	81
Tabela 18 -	Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo Controle 2 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2013 a 2014.....	83
Tabela 19 -	Valores de kappa para cada momento analisado das fêmeas nos Grupos Experimentais 1 e 2 - São Paulo – 2011 a 2013	85
Tabela 20 -	Valores de kappa de todas as fêmeas inseminadas com o inóculo viral monitoradas até 210 dias pós-IA - São Paulo – 2012 a 2013.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	- adenina
AEC	- Artrite e Encefalite Caprina
BIV	- vírus da Imunodeficiência Bovina (do inglês Bovine Immunodeficiency Virus)
BVDV	- vírus da Diarreia Viral Bovina (do inglês Bovine Viral Diarrhea Virus)
c	- citosina
CAE	- Artrite e Encefalite Caprina (do inglês Caprine Arthritis and Encephalitis)
CAEV	- vírus da Artrite e Encefalite Caprina (do inglês Caprine Arthritis Encephalitis vírus)
cELISA	- ensaio imunossorvente ligado a enzima por competição (do inglês: competitive Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
DNA	- ácido desoxirribonucleico
dNTP	- desoxirribonucleotídeo fosfatado
eCG	- gonadotrofina coriônica de equino (do inglês equine chorionic gonadotropin)
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	- Anemia Infecciosa Eqüina (do inglês Equine Infectious Anemia)
env	- envelope
FAO	- Food Agricultural Organization of United Nations
FIV	- vírus da Imunodeficiência Felina (do inglês Feline Immunodeficiency Virus)
FMVZ	- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	- guanina
gag	- group antigen
HCl	- ácido clorídrico

HIV	- vírus da Imunodeficiência Humana
IA	- inseminação artificial
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA	- imunodifusão em agar gel
IFI	- imunofluorescência indireta
I.M.	- intramuscular
KCl	- cloreto de potássio
LVPR	- Lentivírus de Pequenos Ruminantes
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
NaCl	- cloreto de sódio
Nested-PCR	- reação da polimerase em cadeia aninhada (do inglês nested polymerase chain reaction)
OIE	- Organização Internacional de Epizootias
PCR	- polimerase chain reaction
PLV	- puma lentivirus
PNSCO	- Programa Nacional de Sanidade Caprinos e Ovinos
pol	- polimerase
PTFE	- politetrafluoretileno
rev	- regulador de expressão de proteínas do virion (do inglês Regulator of Expression of Virion Proteins)
RNA	- ácido ribonucleico
SAS	- Statistical Analyses System
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SIV	- vírus da Imunodeficiência Símia
SRLV	- Lentivírus de Pequenos Ruminantes (do inglês Small

Ruminant Lentivirus)

t	- timina
tat	- proteína regulatória transativadora (do inglês transactivator regulatory protein)
TBE	- Tris Borato EDTA
TRIS	- hidroxilamina aminometano
USP	- Unversidade de São Paulo
vif	- fator de infectividade viral (do inglês viral infectivity fator)
VMV	- vírus do Visna/maedi (do inglês Visna/maedi virus)

LISTA DE SÍMBOLOS

g	- aceleração da gravidade
sptz/mL	- espermatozoides por miliitro
°C	- grau celsius
L	- litros
≥	- maior ou igual
<	- menor
-	- menos
µg/mL	- micrograma por mililitro
µL	- microlitro
mg	- miligrama
mm	- milímetros
mM	- milimolar
M	- Mol
pb	- pares de base
%	- porcentagem
pH	- potencial hidrogeniônico
kDa	- quilodalton
rpm	- rotações por minuto
TCID ₅₀ /mL	- dose infectante para cultura de tecido por mililitro (do inglês 50% Tissue Culture Infectious Dose per millilitre)
U	- unidade
UI	- unidades internacionais
V	- volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	ETIOLOGIA.....	29
2.2	CLASSIFICAÇÃO.....	30
2.3	EPIDEMIOLOGIA.....	32
2.4	PATOGENIA.....	39
2.5	FORMAS CLÍNICAS.....	41
2.5.1	Forma clínica articular.....	41
2.5.2	Forma clínica mamária.....	43
2.5.3	Forma clínica pulmonar.....	44
2.5.4	Forma clínica nervosa.....	44
2.6	ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	45
2.7	DIAGNÓSTICO.....	46
2.8	TRATAMENTO.....	49
2.9	PREVENÇÃO E CONTROLE.....	49
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1	ANIMAIS, INSTALAÇÃO E ALIMENTAÇÃO.....	53
3.1.1	Grupo experimental 1 (Influência da placenta).....	53
3.1.2	Grupo experimental 2 (Influência do sêmen).....	54
3.1.3	Grupos controles.....	55

3.2	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	56
3.3	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	57
3.3.1	Colheita e processamento dos materiais.....	57
3.3.2	Extração de DNA genômico.....	58
3.3.3	Prova de imunodifusão em ágar gel (IDGA).....	59
3.3.4	Prova de ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA).....	60
3.3.5	Reação em cadeia da polimerase aninhada (nested-PCR).....	61
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
4	RESULTADOS.....	64
4.1	GRUPO EXPERIMENTAL 1 (INFLUÊNCIA DA PLACENTA).....	64
4.2	GRUPO EXPERIMENTAL 2 (INFLUÊNCIA DO SÊMEN).....	70
4.3	GRUPO CONTROLE 1 (FÊMEA LIVRE DE CAEV + SÊMEN LIVRE DE CAEV).....	78
4.4	GRUPO CONTROLE 2 (FÊMEA COM CAEV + SÊMEN COM CAEV).....	80
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	84
4.5.1	Comparação do momento do primeiro diagnóstico positivo entre os testes diagnóstico, por grupo experimental.....	84
4.5.2	Comparação do momento do primeiro diagnóstico positivo entre os grupos experimentais, por teste diagnóstico.....	84
4.5.3	Teste de concordância – valor de kappa.....	85
5	DISCUSSÃO.....	87

CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho caprino bastante significativo no contexto pecuário mundial com 9,313 milhões de cabeças em 2010, um aumento de 1,6% em relação ao ano anterior. Na região Nordeste concentra-se o maior número desses animais, representando, mais de 90,0% do plantel nacional. As Regiões Sul, Sudeste e Nordeste apresentaram crescimento do efetivo destes animais, ao contrário das Regiões Centro-Oeste e Norte, que tiveram queda de 2,1% e 7,5%, respectivamente (IBGE, 2010).

Em 2007 o Brasil ocupou a 19ª posição na produção de leite de cabra mundial, segundo a FAO (2010). A produção do Sudeste é de 12.000L, 54.6% de todo o leite de cabra que é produzido no país, e por apresentar uma cadeia produtiva organizada, com processamento industrial e a garantia de comercialização do leite e de seus derivados, o que assegura a evolução do setor. O mercado está subdividido em venda de leite fluído (93%), venda de leite em pó (4%) e venda de queijos, doces e iogurtes (3%) (BEZERRA JR., 2011).

Com o aumento da produção de leite de cabra no Estado de São Paulo, representando significativo ganho econômico dos pecuaristas no *agrobussines*, os estudos e pesquisas relacionados à sanidade e ao controle de enfermidades nos rebanhos assumiu uma merecida posição de destaque, estimulando os Centros de Pesquisas em Universidades e Serviços das Secretarias da Agricultura instituir programas específicos sobre patogênese e clínicas das inúmeras doenças que acometeriam de forma mais ou menos frequente, esses animais. As criações de São Paulo, num contexto amplo e atual da pecuária nacional, puderam ser assim caracterizadas: propriedades de pequeno porte localizadas próximas aos grandes centros urbanos e cuja exploração principal é a produção de leite (LARA, 2002).

Mesmo se tratando de um sistema de criação muito antigo em nosso país, a caprinocultura ainda apresenta uma série de problemas, que dificultam a produção econômica desses animais e necessitam de urgentes soluções, visando minorar os grandes prejuízos que causam a essa produção agropastoril. De fundamental importância dentre esses fatores, destacam-se as enfermidades infectocontagiosas

ainda muito comuns nos rebanhos brasileiros, associadas a outras, ainda consideradas como emergentes. Entre elas poderiam ser destacadas as verminoses, as broncopneumonias, as doenças dos recém-nascidos, a linfadenite caseosa e a micoplasmose. Além dessas enfermidades, atualmente, merece destaque a Artrite-Encefalite dos Caprinos. Essa enfermidade é uma das maiores responsáveis pela limitação do desenvolvimento da criação produtiva de caprinos, em São Paulo e no Brasil. Levantamentos da taxa de prevalência desta virose demonstraram que o agente está disseminado no rebanho caprino brasileiro, sendo, enzoótica, na maioria das regiões geoeconômicas e dos rebanhos, causando sérios prejuízos econômicos, por descartes prematuros, mortalidade e redução da produtividade (LARA, 2002).

A Artrite-Encefalite Caprina é uma doença exótica, introduzida no Brasil pela inadequada importação de reprodutores de países, que convivem de forma perigosa com a doença. Sua disseminação em nosso país se deu através da indiscriminada distribuição de matrizes impulsionada pelo crescimento da caprinocultura leiteira, com excelente padrão genético de raças especializadas, porém infectadas, oriundas de regiões de tradicional criação de caprinos onde a doença é endêmica como França, Suíça, Holanda, Alemanha, Inglaterra, Canadá e Estados Unidos (LARA, 2002; SHAH et al., 2004).

O primeiro relato de lesões sugestivas da infecção pelo vírus da CAE causando poliartrite crônica foi descrito na Suíça por Stünzi, Buchi e Le Roy (1964). Posteriormente foram descritos poliartrite crônica, no Japão (NAKAGAWA et al., 1971), poliartrite e lesões granulomatosas com desmielinização cerebral, na Alemanha (STAVROU; DEUTSCHLANDER; DAHME, 1969) e leucoencefalomielite, nos Estados Unidos (CORK et al., 1974). O vírus da CAE foi isolado pela primeira vez nos Estados Unidos da América (EUA), em 1979, da membrana sinovial e do líquido cefalorraquidiano de caprinos infectados. O reconhecimento internacional da CAE como uma virose ocorreu em 1980, após a identificação do agente, classificado como um lentivírus da família Retroviridae (CRAWFORD et al., 1980).

No Brasil, o primeiro relato de animais soropositivos e o isolamento do vírus da CAE foram feitos no Rio Grande do Sul (MOOJEN et al., 1986), porém há registros de exames positivos em soros coletados, no Rio de Janeiro, no início da

década de 80 (CUNHA; NASCIMENTO, 1995). Nas várias regiões de criação de caprinos, principalmente de raças leiteiras, tem sido relatados casos clínicos isolados, envolvendo animais infectados pela CAE, esses casos tornam-se mais frequentes e evidenciados, sobretudo pelo crescente número de caprinos acometidos por artrites, mamites e pneumonias (BIRGEL, 2000).

A CAE foi definida como uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, causada por vírus pertencente ao gênero Lentivirus e família Retroviridae. Juntamente com o vírus Visna/maedi, são coletivamente chamados de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LEROUX et al., 1995). O vírus da CAE infecta caprinos de todas as idades, independente do sexo, raça e tipos de produção econômica. Os principais sintomas descritos em casos clínicos desta doença caracterizaram duas formas clínicas preponderantes: a leucoencefalomielite, que acomete cabritos (CORK et al., 1974) e a artrite, mais frequente nos animais adultos (CRAWFORD et al., 1980). Além dessas manifestações clínicas bem definidas, o pulmão e a glândula mamária dos caprinos foram considerados como passíveis de comprometimento nas infecções causadas pelo mencionado vírus, determinando outras duas formas clínicas bem definidas, respectivamente: a pneumonia crônica intersticial, frequentemente denominada por pneumonia progressiva dos caprinos (SIMS; HALE; McCORMICK, 1983); e outra mamária – a mamite intersticial endurativa (LERONDELLE; FLEURY; VIALARD, 1989; ROSADIO; RIVERA, 1993; SMITH; SHERMAN, 1994; SERAKIDES; NUNES; PEREIRA, 1996).

O impacto econômico causado pela infecção do vírus da Artrite-encefalite dos Caprinos foi estudado por vários autores, avaliando o significado dessa enfermidade sobre a produção da caprinocultura e sobre alguns índices de produtividade: produção de leite; índices de fertilidade e na taxa de descarte de caprinos do plantel. Na Alemanha, Von Mockenhaupt e Bauer (1987) apresentaram resultados pioneiros de pesquisa que avaliou alguns índices de produção de cabras sororeagentes ao vírus da CAE, demonstrando que elas apresentavam maior número de problemas de reprodução, com redução do índice de fertilidade por falhas na fecundação e maior intervalo interpartos, além do mais, essas cabras apresentavam menor produção de leite, do que os animais soronegativos. Ao avaliar, a duração média da lactação de cabras infectadas, Greenwood (1995) e Bohland (1998) verificaram que apresentavam menor período de lactação e menor produção de leite com menores

teores lácteos de gordura. Ainda, segundo Bohland (1998), o percentual de descarte dos caprinos sororeagentes ao vírus da CAE foi significativamente maior.

A respeito do aspecto reprodutivo sobre a transmissão do lentivírus caprino, o DNA pró-viral foi detectado em tecidos do trato genital de fêmeas, como útero, oviducto e ovário (FIENI et al., 2003) e em meios de lavagem uterino recuperados após fecundação (FIENI et al., 2002; ALI AL AHMAD et al., 2008a), em células da granulosa (LAMARA et al., 2001), em células epiteliais de oviducto (LAMARA et al., 2002) e em células iniciais de embrião (ALI AL AHMAD et al., 2006) provando serem susceptíveis a infecção pelo CAEV.

A presença de DNA pró-viral da CAEV foi identificada em células prepuciais, plasma seminal e células não espermáticas de ejaculados de machos infectados experimentalmente (TRAVASSOS et al., 1998); em testículo, epidídimo, ampola vesicular, próstata e glândula bulbouretral (PETERSON et al., 2008) e em glândula vesicular (ALI AL AHMAD et al., 2008b) também indicando que esses tecidos e células do trato reprodutor masculino contribuem para a transmissão do lentivírus caprino.

Diante de tantas evidências no que tange a presença do CAEV nos tratos reprodutivos tanto feminino quanto masculino, uma demanda crescente por mais estudos da transmissão do lentivírus caprino sob o aspecto reprodutivo foi constatada.

Cortez-Romero et al. (2013) solicitam que novos estudos sejam realizados para confirmar a possibilidade de transmissão sexual, inseminando-se fêmeas não-infectadas com ejaculados positivos para CAEV ou por monta natural com bodes infectados. Ainda recomendam estudos com IA para determinar o exato grau de risco na lavagem realizada em sêmen de machos infectados, inseminando-se fêmeas livres de SRLV. Já na transmissão vertical, o exato mecanismo de transmissão *in utero* deve ser elucidado.

Relatos de casos de soroconversões inexplicáveis de proles separados de suas mães aumentam a suspeita da transmissão *in utero* ou durante parto (ADAMS et al., 1983; EAST et al., 1993).

Blacklaws et al. (2004) afirmam que poucos estudos foram realizados para permitir a elaboração de quaisquer conclusões definitivas, e por isso, estudos adicionais são justificados.

Ali Al Ahmad et al. (2012) afirmam que estudos adicionais são necessários para avaliar se a transmissão do DNA pró-viral do CAEV via IA ou monta natural pode resultar em infecção para as fêmeas.

Nos estudos de Souza (2010) e Souza et al. (2013), não há informações de acompanhamento da prenhez e parto das fêmeas inseminadas com CAEV.

Com o intuito de aprofundar os conhecimentos sobre o vírus da Artrite-Encefalite Caprina e sabendo da existência de poucos estudos e da crescente demanda por parte de pesquisadores na área para elucidar o aspecto reprodutivo na transmissão, o objetivo deste estudo é avaliar experimentalmente a transmissibilidade do lentivírus caprino causador da Artrite Encefalite Caprina por vias placentária e sêmen, utilizando-se técnicas diagnósticas por IDGA, cELISA e nested-PCR.

Este estudo poderá alcançar maiores informações quanto à transmissibilidade do vírus, podendo contribuir assim, para o planejamento de estratégias no programa de controle e erradicação da doença em rebanhos inserida no PNSCO do MAPA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O vírus da CAE é um RNA vírus envelopado de 80 a 100 nanômetros, não oncogênico, que pertence à família Retroviridae e subfamília Orthoretrovirinae, gênero Lentivirus. No gênero Lentivirus estão inclusos, além do CAEV, o Visna/maedi virus (VMV), os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2). Neste gênero, encontramos também os vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) e Lentivirus puma (PLV) (ICTV, 2005).

Os lentivírus são partículas esféricas, envelopadas com aproximadamente 100 nm de diâmetro com núcleo cônico e denso, no qual estão inseridas moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo (GONDA et al., 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias e de superfície. Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998). O genoma viral do CAEV é formado por duas fitas simples de RNA sentido + (CHEEVERS; ROBERSON; KLEVJER-ANDERSON, 1981), contendo os genes gag, env e pol, típicos da família Retroviridae, e os genes regulatórios tat, rev e vif. O gene gag codifica as proteínas estruturais que constituem o vírion (MA-matriz e CA-capsídeo), o gene pol codifica as várias enzimas responsáveis pelo processo de transcrição reversa e integração proviral (RT-transcriptase reversa, PR-protease e IN-integrase) e o gene env codifica glicoproteínas presentes na superfície do vírion (SU-superfície e TM-transmembranar) com a capacidade de se ligar e fundir com as células alvo. A proteína vif está associada com a infectividade viral e com o controle da produção das partículas virais infecciosas, enquanto que as proteínas tat e env estão envolvidas com a regulação da expressão viral (CLEMENTS; PAYNE, 1994; JOAG; STEPHENS; NARAYAN, 1996).

Os lentivirus são espécie-específicos e se replicam apenas em uma limitada população de células de seus hospedeiros (CLEMENTS; PAYNE, 1994). Eles são

capazes de se replicar em células diferenciadas que não estão se replicando, ou seja, não dependem da síntese de DNA celular para sua replicação, o que os difere de outros grupos de retrovírus. Entretanto, estas células precisam ser ativadas para produzir a progênie viral (CLEMENTS; PAYNE, 1994). A partir da transcrição reversa, o RNA genômico dá origem ao DNA proviral, o qual se integra ao genoma das células-alvo, como monócitos, macrófagos e/ou linfócitos T CD4, sendo que a replicação ocorre preferencialmente em algumas populações de macrófagos teciduais, resultando na produção e excreção do vírus infeccioso no leite e provavelmente secreções respiratórias (NARAYAN et al., 1992).

O vírus da CAE possui três características gerais que promovem a persistência da infecção em seus hospedeiros. Primeiro, após a transcrição reversa do RNA viral nas células infectadas, o DNA pró-viral se integra no genoma celular, permitindo que o vírus escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro e preserve o seu genoma. Segundo alguns autores ele se multiplica em células do sistema imunológico, normalmente responsáveis pela eliminação de células infectadas, assim, o hospedeiro não consegue desenvolver resposta imunológica curativa. Além disso, a restrição da expressão viral sem produção de partículas virais, permite que as células infectadas pelo vírus escapem do sistema imunológico (NARAYAN et al., 1992). E por último, esse vírus acumula alta taxa de mutação durante o processo de replicação, resultando em variabilidade genética e fenotípica escapando, assim, do sistema imunológico do hospedeiro (CHEEVERS; McGUIRE; NORTON, 1993).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

Estudos referentes à área de biologia molecular teve início em 1985 em que Chiu et al. comparou os genomas dos retrovírus da subfamília Lentivirus causadores da artrite encefalite caprina, anemia infecciosa equina e síndrome da imunodeficiência adquirida humana. Desde então se descobriu um campo fértil para diversas pesquisas relacionadas ao vírus da CAE. Algumas delas se dedicaram a padronização das técnicas biomoleculares com o intuito de auxiliar e fornecer como alternativa aos métodos de diagnóstico (REDDY; SAPP; HENEINE, 1993; RIMSTAD

et al., 1993; BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995; CHEBLOUNE et al., 1996; RUSSO et al., 1997) a detecção do agente em diferentes tipos de amostras e a investigação dos meios de transmissão do vírus. Outras tiveram direcionamento ao estudo filogenético do genoma do vírus da CAE. Obteve-se muitas descobertas com relação à variedade existente no vírus permitindo a sua classificação em grupos e subgrupos, evidências tanto na queda da barreira de transmissão interespecies quanto na disseminação mundial do vírus por meio do comércio de animais.

No Brasil, Castro et al. (1999) sequenciaram os primeiros isolados de caprinos provenientes dos estados de Minas Gerais e Pernambuco. Um isolado de caprino sequenciado mostrou-se mais próximo ao vírus Visna/maedi do que ao vírus da Artrite encefalite caprina sugerindo possível transmissão interespecies. Ravazzolo et al. (2001) foram responsáveis pela análise filogenética do primeiro lentivirus isolado de ovino proveniente do estado do Rio Grande do Sul. O estudo sugere como possível marcador a presença de uma deleção no gene gag no vírus do Visna/maedi para diferenciar a transmissão de lentivirus entre ovinos e caprinos.

Zanoni et al. (1998) apresentou uma classificação para os diferentes tipos virais sequenciados de CAEV e Visna/maedi existentes até então. Foi dividido em seis grupos nomeados em I, II, III, IV, V e VI. Os seis isolados puderam ser diferenciados, porém sem uma clara separação entre as linhagens dos Lentivirus de Pequenos Ruminantes derivados de caprinos (Vírus da Artrite Encefalite Caprina) ou de ovinos (vírus do Visna/maedi).

Porém a classificação sugerida por Zanoni et al. (1998) considerou sequências curtas de isolados. Com isso, foi sugerido uma nova reclassificação por Shah et al. (2004) baseados em sequências longas e de 104 isolados provenientes da Suíça e em seis sequências disponíveis no banco de dados Genbank. O estudo propôs a divisão em quatro grandes grupos nomeados em A, B, C e D com subdivisões em cada. O subgrupo B1 possui isolados provenientes da França, Brasil, Estados Unidos e Suíça, não existindo significativas diferenças entre elas o que sugeriu uma propagação do vírus por meio do comércio internacional de animais. No Brasil, são encontrados os subgrupos B1 e C circulantes nos caprinos. (SHAH et al., 2004; FEITOSA et al., 2010; HASEGAWA, 2010).

Recentes estudos de Lentivirus de Pequenos Ruminantes apontam para a uma nova direção. Glaria et al. (2009) mostraram a importância de uma possível correspondência entre genótipo e fenótipo e trouxeram evidências de controvérsia na área de pesquisa dentro dos Lentivirus de Pequenos Ruminantes. Murphy et al. (2010) estudaram a associação do tropismo tecidual e a variação da sequência promotora no vírus da Artrite Encefalite Caprina.

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A infecção e doença causadas pelo vírus da Artrite-encefalite dos Caprinos foram consideradas cosmopolitas (LARA, 2002), pois está amplamente distribuída no mundo e ocorre com mais frequência nos países de desenvolvimento industrial com prevalência variando de 65% a 81% em rebanhos leiteiros (ADAMS; OLIVER; AMEGHINO, 1984; BÉLANGER; LEBOEUF, 1993). No referido estudo Adams, Oliver e Ameghino (1984), examinaram pelo teste de imunodifusão em gel de ágar, 3729 amostras de soro sanguíneo de caprinos, criados em 14 países localizados nos cinco continentes: América do Norte, Central e do Sul, Europa, Oceania e África. Na população avaliada, 33,9% foram positivas, demonstrando a ocorrência da infecção pelo referido vírus; além do mais, destacaram que da amostragem avaliada e que apresentavam anticorpos antivírus da Artrite encefalite, 90,4% eram originárias de países localizados na Europa e América do Norte. Nos demais países estudados, 20% dos animais sororeagentes não eram autóctones, mas sim oriundos de importação e apenas 0,7% eram de caprinos nativos, que tiveram anterior contato e convivência com animais importados soropositivos.

No Brasil, a CAE foi diagnosticada em vários estados. Em 2008, um levantamento sorológico para CAEV na região metropolitana do Ceará apresentou 12,8% de soroprevalência dos 125 caprinos testados (CAMINHA et al., 2008). Nos outros estados da região Nordeste, a prevalência encontrada foi de 13,40%; 0,73% e 26,1% na Bahia (ALMEIDA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2006; TIGRE; CAMPOS; SARDI, 2006), de 4,4% e 2,5% no Piauí (PINHEIRO et al., 1996; BATISTA et al., 2004), de 2,2% e 8,2% na Paraíba (CASTRO et al., 2002; BANDEIRA et al., 2009),

de 11,0% no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2005), de 50,6% no Maranhão (ALVES; PINHEIRO, 1997), de 17,7% e 3,9% em Pernambuco (CASTRO; NASCIMENTO; ABREU, 1994; CASTRO et al., 2002) e de 4,25% em Sergipe (MELO et al., 2003). Por outro lado, prevalências superiores a 20% são relatadas nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, onde a produção leiteira destaca-se por seu manejo mais intensivo (ASSIS; GOUVEIA, 1994; FERNANDES; ARAÚJO; CASTRO, 2003).

Com relação à ocorrência da CAE nos rebanhos foram estudados vários fatores de variabilidade que poderiam influir na taxa de prevalência da infecção. Entre eles mereceram destaque fatores etários; sexuais; raciais e sistema de criação, com suas variadas técnicas. A infecção acomete animais de ambos os sexos, várias raças e idades. Um fator muito importante é o tempo de exposição para a soroconversão. Assim, tem-se observado que a frequência de soropositivos é maior em caprinos mais velhos (HOUWERS; VAN DER MOLEN, 1987; ROWE et al., 1991; LARA, 2002), contudo em rebanhos com alta taxa de infecção a soroprevalência pode ser bastante elevada entre animais jovens (EAST et al., 1987). No Estado do Ceará, Melo e Franke (1997) encontraram uma relação direta entre o sistema de manejo intensivo de criação e o grande número de animais sororeagentes à infecção pelo vírus da CAE, sugerindo que essa ocorrência poderia, facilmente, ser explicada pelo permanente confinamento dos animais, em estreito contato corporal e pela amamentação coletiva dos cabritos: duas condições que favorecem a disseminação do vírus no rebanho. Essas afirmações foram confirmadas por Ramalho (2000), ao relatar que a taxa de prevalência da CAE, em animais criados no estado da Bahia em regime semi-extensivo (35,4%) de criação foi significativamente maior do que nos caprinos criados em sistema extensivo (1,2%), típico para animais produtores de carne. Além do mais, demonstrou que no sistema intensivo de criação, sob supervisão eficiente de Clínicos Veterinários, orientada para a preservação da saúde animal a taxa de prevalência não atingia valores desesperadores, pois na população avaliada essa taxa equivalia a 9,6% de caprinos sororeagentes aos antígenos do vírus da CAE.

O vírus da CAE é considerado como causador de uma infecção permanente, pois o vírus persiste no organismo por toda a vida do animal, havendo a possibilidade da viremia ser permanente, por isso o reservatório e a fonte de

infecção da CAE são justamente os animais infectados, que transmitem o agente por meio de secreções ou excreções ricas em células do sistema monocítico-fagocitário. Para Guedes, Souza e Gouveia (2001), a infecção e/ou soro positivo não estão obrigatoriamente relacionadas com a presença de sinais clínicos, uma vez que apenas 35% dos animais infectados apresentam algum sinal característico. Relata ainda, que apesar da soroprevalência da CAE em um rebanho poder atingir 90%, a maioria dos animais infectados não desenvolve sintomatologia clínica. A ocorrência de alguns rebanhos com quase a totalidade dos animais infectados tem sido explicada e atribuída ao fato da infecção poder persistir por toda a vida do animal e apresentar, inúmeras vezes uma evolução assintomática, ou não diagnosticada, tornando esses animais fontes de infecção (NARAYAN et al., 1992). A doença pode levar vários meses e até anos para se manifestar; portanto os animais nessas condições representam um importante elo de transmissão, pois aparentemente são saudáveis, mas são portadores do vírus e podem transmiti-lo aos demais animais.

Nos caprinos, a transmissão ocorre geralmente por via digestiva, pela ingestão de colostro e leite contaminados, sendo o colostro considerado a mais importante via de transmissão do vírus (ADAMS et al., 1983; PERETZ; ASSO; DEVILLECHAISE, 1993). Apesar de ter um significado menor, a transmissão horizontal, por fezes, saliva, secreções respiratória e urogenital e, sobretudo, leite contaminante dos copos das ordenhadeiras mecânicas, tem sido considerada importante, dependendo da situação particular de cada criação (ADAMS et al., 1983; PERETZ; ASSO; DEVILLECHAISE, 1993). A transmissão por fômites também pode ocorrer por meio de agulhas, seringas, instrumentos cirúrgicos, tatuadores e ordenhadeira mecânica, além disso, o próprio tratador pode contribuir para disseminação da doença no rebanho assim como a falta de higiene nas instalações.

A transmissão vertical pode ocorrer, pois já foi observado a soroconversão de cabritos que foram separados imediatamente após o parto e receberam colostro e leite de vaca pasteurizado (EAST et al., 1993). O aleitamento coletivo adotado em criações intensivas foi relatado como uma forma de manejo que favoreceria a disseminação da infecção viral (ELLIS et al., 1986).

Com relação a possível transmissão vertical do vírus da CAE diversos pesquisadores vêm estudando esta questão na epidemiologia da doença. Robinson

e Ellis et al. (1986); Rowe et al. (1992) e East et al. (1993) relataram que nem toda infecção pelo agente da CAEV em crias pode ser explicada pela ingestão de colostro ou leite, visto que crias nascidas de mães soropositivas têm chance de 10% de soroconversão até os seis meses de idade por causas não esclarecidas mesmo utilizando-se de aleitamento com leite pasteurizado (ROBINSON; ELLIS, 1986; ROWE et al., 1992; EAST et al., 1993). Desta forma considerando a transmissão no peri-parto esta poderia ocorrer devido à transmissão intrauterina, transmissão através do contato vaginal durante o nascimento (pelas vias fetais moles: canal cervical, vagina e vulva) ou transmissão por exposição à saliva ou secreção respiratórias durante o ato de lambedura (ALVES, 1999).

Adams et al. (1983) descreveram soroconversão em grupos de crias que não mamaram o colostro, sendo 17% (3/18) de animais lambidos pela mãe infectada, 10% (1/10) que nasceram de parto normal e 2,7% (1/37) que nasceram de cesariana. East et al. (1993) em outro estudo semelhante constaram que 7,5% (3/40) das crias soroconverteram na décima segunda semana após o parto normal e do total das 40 crias, 6 (15%) soroconverteram na vigésima semana de idade. East et al. (1993) e Ellis, Robinson e Wilcox (1983) utilizando tecidos de fetos e soro de crias que não mamaram o colostro e leite e, Adams et al. (1983), com crias através de parto cesariano e normal, os quais também não mamaram o colostro e leite, relataram, após acompanhamento por 6 meses das crias, soroconversão dos mesmos.

Considerando-se a presença do DNA proviral no trato reprodutivo das fêmeas, detectado por meio de técnicas de biologia molecular, o vírus já foi identificado no útero, oviduto e no meio de lavagem uterina de animais naturalmente infectados (ANDRIOLI et al., 2002; FIENI et al., 2002). Andrioli et al. (2004) realizaram o lavado uterino de dez cabras Saanen sabidamente positivas ao vírus da CAE, submetendo o material obtido a técnica de nested-PCR e, também, ao isolamento viral em cultura de células primárias de membrana sinovial de caprinos. Estes autores detectaram a presença do vírus em 87,5% e 37,5% das amostras para nested-PCR e isolamento viral, respectivamente, e concluíram que matrizes portadoras do vírus podem contaminar suas crias durante a prenhez ou peri-parto, mas não foram capazes de determinar especificamente qual seria a forma de transmissão. Semelhantemente a estes últimos autores, Pinheiro (2001),

trabalhando com colheita de embriões observou que das 10 amostras de fluido uterino coletadas de cabras infectadas com CAE, 37,5% foram positivas ao isolamento e 70% pela técnica de nested-PCR.

Recentemente o DNA pró-viral também foi detectado em 47,1% dos ovários de cabras de abatedouro na França, sendo este DNA encontrado especialmente em células do *cumulus oophorus* (ALI AL AHMAD; FIENI; MARTIGNAT, 2005). Semelhantemente, em ovinos, Cortez-Romero et al. (2006) também observaram, em células do *cumulus oophorus* de animais naturalmente infectados, o Visna/maedi vírus (VMV), o qual apresenta uma estreita correlação genética com o CAEV. Da mesma forma, Silva (2006) estudou a presença do CAEV em tecido ovariano de cabras naturalmente infectadas, por meio de imunohistoquímica e semi-nested-PCR e relatou a identificação do DNA pró-viral em 4/18 (22%) das amostras de córtex avaliadas, todas de animais sorologicamente positivas para o CAEV, utilizando-se da semi-nested-PCR. Ainda neste contexto Lamara et al. (2001) relataram que as células da granulosa são susceptíveis a infecção pelo CAEV in vitro.

Questionando-se sobre a possibilidade do CAEV estar presente nos oócitos ovarianos Silva (2006) considerou que os oócitos inclusos em folículos pré-ovulatórios apresentam a zona pelúcida (zp) completamente formada ao redor do oócito, o que pode protegê-los da infecção pelo CAEV, já que o vírus não é capaz de ultrapassar a barreira da zp (LAMARA et al., 2002). Por outro lado folículos em estágio inicial de desenvolvimento, como nos folículos pré-antrais, ainda não possuem a zp completamente formada, desta forma, o oócito estaria susceptível a infecção pelo CAEV, portanto a infecção de gametas ainda no ovário poderia levar ao nascimento de crias infectadas. É importante ressaltar que em folículos pré-antrais a zona pelúcida não está completamente formada, permitindo, teoricamente, a infecção dos oócitos pelo vírus (SILVA, 2006). Neste contexto Hofmann et al. (2004) já relataram que, em bovinos, os lentivirus tem capacidade de expressar suas proteínas em oócitos, inclusive com a produção de crias transgênicas a partir de oócitos infectados com injeções subzonais de lentivirus geneticamente modificados. Por conseguinte, Silva (2006) concluiu que esta infecção do tecido ovariano pelo CAEV pode ter importante papel na etiopatogenia da enfermidade, uma vez que o metabolismo ativo dos oócitos, a ausência da zona pelúcida e o contato direto com as células da granulosa e os elementos do estroma ovariano, tornam os oócitos

inclusos em folículos ovulatórios pré-antrais potencialmente susceptíveis a infecção por patógenos virais. Sendo assim, uma vez infectados estes oócitos poderiam carrear este material genético até o momento da fecundação com consequente produção de crias infectadas.

No tocante à correlação entre a utilização de biotécnicas da reprodução e a infecção pelo vírus da CAE Lamara et al. (2000) trabalhando com embriões, observaram que células da granulosa de caprinos são susceptíveis à infecção e replicação do CAEV em cultura, porém não determinaram se este fato pode influenciar na transmissão para as crias. Entretanto Salles et al. (1998) concluíram que esta é uma técnica eficiente para evitar a transmissão do vírus da CAE, além disso o vírus não reduz diretamente a capacidade reprodutiva das fêmeas, contudo provavelmente com o agravar da enfermidade esta capacidade possa ser alterada, mas não por ação direta do vírus ao nível de ovário, mas pelo estado de desnutrição que os animais possam atingir.

Eggert-Kruse et al. (2000) observaram em humanos a presença de barreiras de defesa naturais encontradas normalmente em secreções vaginais e de cérvix. Ali Al Ahmad; Fieni e Martignat (2005) relata a ausência dessas barreiras de defesa naturais em caprinos que juntamente com a alta concentração de partículas infectantes, observou alta frequência de infecção em fêmeas. Se houvesse essas barreiras de defesa em caprinos, a inseminação intrauterina assim como a inseminação intrauterina transabdominal laparoscópica ultrapassariam completamente por essas defesas naturais no hospedeiro, e no caso da inseminação transcervical, o lentivirus encontraria esses mecanismos de defesa na cérvix (CORTEZ-ROMERO et al., 2013).

Também estudando a transmissibilidade do vírus da CAE por transmissão vertical Lara, Birgel Júnior e Birgel (2005) relataram que, apesar dos riscos, a probabilidade de infecção do vírus da CAE por transmissão vertical (transplacentária ou durante o parto) foi menor que 1/26, o que é menor do que 3,8% e, estão de acordo com Narayan e Cork (1990), os quais consideram que a infecção transplacentária do feto por meio do sangue verídico da mãe não parece ser a mais importante rota de disseminação da doença.

A transmissão por via transplacentária ou por monta natural, em caprinos, ainda não foi comprovada de forma insofismável (BIRGEL, 2000; LARA, 2002).

O sêmen representa um significativo risco potencial para a propagação de doenças infecciosas. Esse risco é vinculado a numerosos microrganismos patogênicos, que podem estar presentes no sêmen, e ao fator multiplicador pela numerosa quantidade de palhetas preparadas a partir de cada ejaculado. Esse risco persiste ao longo do tempo, pois a maioria dos microrganismos sobrevive ao processo de congelamento e descongelamento do sêmen. A transmissão de doenças virais via sêmen é um problema significativo tanto na medicina humana como veterinária (CORTEZ-ROMERO et al., 2013).

A presença do DNA pró-viral do lentivirus caprino tem sido identificada em tecidos de órgãos sexuais masculinos, em células não espermáticas, em plasma seminal e em ejaculados provenientes de bodes infectados (TRAVASSOS et al., 1998; ANDRIOLI; GOUVEIA; PINHEIRO, 1999; PETERSON et al., 2008; CRUZ et al., 2009; GREGORY et al., 2009) favorecendo o potencial de transmissão horizontal de macho para fêmea, tanto por monta natural como por IA, e/ou verticalmente de macho para progênie (ANDRIOLI; GOUVEIA; PINHEIRO, 1999; CORTEZ-ROMERO et al., 2013).

Teoricamente SRLV podem ser encontrados em órgãos sexuais e sêmen de bodes infectados em três diferentes formas: como DNA pró-viral incorporado em macrófagos, como virions (partículas virais completas com fita simples de RNA e envelope protéico produzidos a partir de brotamento da membrana plasmática) e como vírus livre produzidos por lise celular (PETERSON et al., 2008).

Segundo Nash, Hanson e Coats (1995) e Quayle et al. (1997), pouco se conhece sobre fatores que interferem na presença do CAEV no sêmen, porém como os lentivírus infectam monócitos e macrófagos, a presença de inflamações ou infecções no órgão reprodutor poderia desencadear o maior fluxo destas células inflamatórias, resultando em aumento da carga viral no sêmen (ANDRIOLI et al., 2006).

No entanto, apesar de haver a demonstração da presença de SRLV no plasma seminal e nas células não espermáticas, não há estudos mostrando

resultados positivos no espermatozoide que parece resistir à infecção pelo lentivírus (BLACKLAWS et al., 2004). Essa resistência in vivo do espermatozoide a infecção do lentivirus pode ser explicada pelas proteínas presentes no epidídimo que protegem o espermatozoide durante seu trânsito pelo trato genital masculino. Essas proteínas, ao recobrir o espermatozoide, estabiliza a membrana plasmática prevenindo uma prematura reação acrossomal (THIBAULT, 2001). Ali Al Ahmad et al. (2008b) sugerem a ausência de receptores necessários para a internalização da partícula de SRLV na membrana plasmática de espermatozoide como hipótese para explicar a resistência in vivo do espermatozoide.

Com isso, cogitou-se o uso de métodos físicos para separar os espermatozoides do fluido seminal, visando assim, a eliminação dos patógenos. Mas segundo Andrioli et al. (2006) a lavagem do sêmen caprino diminui a carga viral, porém não elimina totalmente o lentivírus caprino no sêmen, assim como o dano testicular é um fator que influencia a presença do lentivírus caprino no sêmen.

2.4 PATOGENIA

Os lentivírus são introduzidos no organismo dos animais susceptíveis geralmente por via digestiva ou respiratória (HUSSO; NARAYAN; HART, 1988). Em seguida o vírus infecta as células do sistema monocítico-fagocitário, produzindo a infecção persistente do hospedeiro. Uma vez dentro dessas células, o RNA genômico dá origem ao DNA proviral, sob a ação da enzima viral transcriptase reversa. O produto se integra ao genoma das células-alvo, ou seja, monócitos e macrófagos, constituindo o chamado pró-vírus. Os mecanismos desenvolvidos pelos lentivírus para persistência da infecção frente à resposta imune incluem: capacidade dos monócitos de conter pró-vírus integrado em seu genoma sem ser detectado pelo sistema imune, pois a expressão do gene viral só é ativada quando os monócitos maturam para macrófagos (BRODIE et al., 1995); capacidade de infectar persistentemente macrófagos, sem causar lise celular, podendo disseminar o vírus no próprio hospedeiro, sem a produção de partículas virais, através do contato com outras células (NARAYAN et al., 1984); interrupção do ciclo viral pelo

processamento incompleto das proteínas de superfície (CHEBLOUNE et al., 1996); replicação de variantes antigênicos na presença de anticorpos neutralizantes e produção de interferon, que diminui o índice de replicação e favorece a persistência do estímulo antigênico (KLEVJER-ANDERSON; McGUIRE 1982; NARAYAN et al., 1984; ZINK et al., 1987; CHEEVERS; McGUIRE; NORTON, 1993; BERTONI et al., 1994). A alta mutabilidade do agente que pode resultar em variantes antigênicas funciona como mecanismo de escape da resposta celular e humoral (KNOWLES; CHEEVERS; McGUIRE, 1990; CHEEVERS; McGUIRE; NORTON, 1993; LICHTENSTEIGER; CHEEVERS; DAVIS, 1993). Entre as várias proteínas dos CAEV, duas estão mais diretamente envolvidas com a produção de anticorpos pelo hospedeiro: uma glicoproteína do envelope, de peso molecular de 135 kDa (gp135), e uma nucleoproteína de peso molecular de 28 kDa (p28) (JOHNSON; BARBET; KLEVJER-ANDERSON, 1983; GOGOLEWSKI; ADAMS; McGUIRE, 1985; KNOWLES; CHEEVERS; McGUIRE, 1991). Tem-se observado que alguns animais infectados apresentam anticorpos detectáveis por testes sorológicos tardiamente (RIMSTAD et al., 1993). A produção de anticorpos e sua concentração no sangue de um animal infectado são influenciadas por situações de estresse, pela presença de outras doenças, condição alimentar e idade (FRANKE, 1998). Em relação à produção de anticorpos neutralizantes o CAEV não induz a formação deste tipo de anticorpos em infecções naturais ou experimentais (TEIXEIRA, 1996). Embora ocorra produção de anticorpos, o sistema imune do hospedeiro não é efetivo em eliminar os lentivirus (BRODIE et al., 1992).

A infecção pelo lentivírus, geralmente persistente e assintomática, pode causar afecção multissistêmica, de evolução geralmente crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte (CALLADO; CASTRO; TEIXEIRA, 2001; LARA et al., 2005; GREGORY et al., 2006). Processos inflamatórios, quando presente no hospedeiro, permitem que o vírus chegue ao SNC, pulmões, articulações, glândula mamária e outros órgãos através dos monócitos, onde ocorre posteriormente a maturação destes em macrófagos. A diferenciação em macrófagos ativa a expressão do gene viral e os vírus são então produzidos nestes órgãos (CLEMENTS; PAYNE, 1994).

O vírus causador da CAE pode provocar quatro formas clínicas da doença: articular (artrite crônica), mamária (mamite endurativa em cabras adultas), pulmonar

(pneumonia progressiva aguda) e nervosa (leucoencefalomielite). Em animais de diferentes faixas etárias são observadas diferentes aspectos clínicos, caracterizando basicamente quatro formas clínicas: 1) leucoencefalomielite e pneumonia progressiva aguda, em recém-nascidos e cabritos de até 4 meses de idade (CORK et al., 1974); 2) artrite crônica (CRAWFORD et al., 1980); 3) mamite endurativa em cabras adultas (WOODARD et al., 1982); 4) pneumonia e encefalite progressiva crônica e esporádica, em animais adultos (SUNDQUIST et al., 1981). Além dessas formas, há registro, em animais soropositivos, de alterações inflamatórias nos rins, proliferação de células linfóides no baço e linfonodos (GONZALEZ et al., 1987) e infiltrações mononucleares do endométrio (ALI, 1987).

2.5 FORMAS CLÍNICAS

2.5.1 Forma clínica articular

As primeiras informações sobre uma enfermidade enzoótica articular de caprinos, com descrição dos sinais clínicos e das alterações anatomopatológicas, foram apresentadas na Suíça por Stünzi, Buchi e Le Roy (1964). A doença, denominada artrite crônica endêmica dos caprinos, foi considerada como de origem hereditária. Na descrição das alterações da articulação do carpo, observaram-se aumento de volume circular da articulação. As lesões iniciavam-se na face extensora da articulação, atingindo uni ou bilateralmente os membros anteriores.

A forma clínica articular foi caracterizada como uma doença de desenvolvimento insidioso, pois geralmente, progride lentamente, de meses a anos, podendo aparecer repentinamente em alguns animais, permanecendo a seguir estática. Em outros casos, após a instalação dos sintomas, a evolução e o agravamento das manifestações progrediam rapidamente, entretanto, em alguns desses casos observou-se evolução lenta, mas progressiva, podendo ser acompanhada durante vários anos (NARAYAN; CORK, 1990).

A forma clínica articular, caracterizada por artrite progressiva, foi descrita em animais adultos com mais de seis meses de idade (EAST, 1996), sendo mais frequente em animais de dois a nove anos de idade (NARAYAN; CORK, 1990). As articulações do carpo foram consideradas as mais afetadas. Com menor frequência ocorreu em outras articulações como a do jarrete, a patelar e a atlanto-occipital (LARA et al., 2005). Com o evoluir da doença observou-se: aumento de volume da articulação, caracterizado por claudicação intensa, dificuldade do animal para deitar e para se erguer e, conseqüentemente, haveria evidente emagrecimento. O líquido sinovial, que foi descrito como menos viscoso do que de articulações sadias e sua coloração variaria do amarronzado ao avermelhado, com redução na proteína e significativo aumento do número de células sinoviais 1.000 a 20.000 células/ mm³, com 90% de células mononucleares das quais 60-70% são linfócitos (GREGORY et al., 2006).

O aumento de volume observado, na maioria das vezes o aumento da região, se daria pela hiperplasia da cápsula articular e dos tecidos tendinosos e conjuntivo associados à articulação comprometida, dor articular. Esses motivos causariam uma restrição dos movimentos, determinando atitudes e aprumos anormais, como por exemplo, genuflexão temporária ou permanente ao locomover-se apoiando os membros anteriores sobre a face extensora da articulação do carpo. Também se demonstrou a ocorrência da anquilose da articulação e calosidade da superfície permanentemente fletida da articulação ou erosões na pele que a recobre (EAST, 1996). As radiografias das articulações precocemente afetadas revelam tumefação do tecido mole anteriormente ao carpo e por vezes ao tarso. Esse quadro tem evolução pelo surgimento de depósitos calcificados no tecido periarticular, cápsulas articulares, ligamentos, tendões e bainhas tendinosas. As alterações ósseas são branda reação periosteal, mineralização periarticular e irregularidade das superfícies ósseas proximais e distais à articulação (SMITH, 1993).

2.5.2 Forma clínica mamária

Na glândula mamária de cabras infectadas, natural ou experimentalmente, descreveu-se o endurecimento gradativo e difuso do parênquima resultando em assimetria das metades do úbere, quando observado por inspeção com visão posterior (PERK, 1988). Smith e Cutlip (1988); Lerondelle et al. (1995) e Lerondelle, Godet e Mornex (1999) afirmaram a ocorrência da diminuição da produção láctea nas cabras acometidas pela CAE e a mamite consequente desenvolvia-se de forma difusa, sendo caracterizada por endurecimento progressivo não edematoso ou de forma nodular, com a presença de vários nódulos de consistência dura, que confluem para determinar um endurecimento difuso do parênquima mamário. As alterações histopatológicas evidenciaram infiltrações perivasculares e do próprio parênquima glandular por células mononucleares, por linfoproliferação e hiperplasia dos folículos linfoides e que muitas vezes evoluem para calcificação e necrose dos alvéolos (ZWAHLEN et al., 1983; GONZALEZ et al., 1987; CHEEVERS et al., 1988; McGUIRE et al., 1988; PERK, 1988; BIRGEL JUNIOR et al., 2005). A diminuição da produção leiteira de cabras infectadas pelo vírus da CAE foi demonstrada também por Bohland (1998) no Brasil, sendo que as cabras sadias produziam entre 25 e 31% de leite a mais em relação aos animais infectados. Os caprinos sadios apresentavam lactações até 17% mais longas do que os infectados. Relacionando a ocorrência de mamite endurativa, Birgel Junior et al. (2005) observou que do total de 97 glândulas palpadas, o endurecimento difuso da glândula mamária foi diagnosticado em 19,68% das cabras infectadas pelo vírus da CAE, enquanto Lara et al. (2005) na sua pesquisa sobre as formas clínicas da artrite encefalite caprina encontrou 6,6% de cabras sororeagentes com mamite endurativa. Segundo Birgel Junior et al. (2005) a infecção pelo referido vírus determina significativa influência na composição físico-química e celular do leite de caprinos, sendo que os valores de eletrocondutividade, os teores de cloretos e a contagem de células somáticas foram maiores nas cabras infectadas pelo vírus com ou sem sinais de endurecimento difuso da mama; enquanto os valores de proteína, gordura e sólidos totais foram menores somente no grupo de cabras infectadas pelo vírus com sinais de endurecimento difuso da mama.

2.5.3 Forma clínica pulmonar

A apresentação pulmonar é rara e de menor gravidade entre caprinos. Os sintomas são tosse, dispneia após exercícios físicos, taquipneia, macicez pulmonar, estertor úmido à auscultação e comprometimento do estado geral (DE LA CONCHA-BERMEJILLO, 1997). As alterações macroscópicas encontradas são aderências pleurais, pulmões pesados e firmes à palpação e áreas de coloração rósea-acinzentadas (ROBINSON; ELLIS, 1984; NARAYAN; CORK, 1985; CUTLIP et al., 1988; PERETZ; ASSO; DEVILLECHAISE, 1993; PEREIRA, 1995; CALLADO; CASTRO; TEIXEIRA, 2001). Os achados microscópicos são pneumonia intersticial e broncointersticial (ROBINSON; ELLIS, 1984; NARAYAN; CORK, 1985; CUTLIP et al., 1988; PERETZ; ASSO; DEVILLECHAISE, 1993; MORNEX et al., 1994; PEREIRA, 1995; CALLADO; CASTRO; TEIXEIRA, 2001).

2.5.4 Forma clínica nervosa

A forma nervosa é de menor importância, tendo sido relatada em cabritos, de um a quatro meses de idade ou, menos frequentemente, em caprinos mais velhos, em associação com a forma articular. Os animais, mesmo mantendo o apetite e a atividade mental normais, apresentam ataxia e paresia uni ou bilateral dos membros posteriores, que evolui para tetraparesia (NARAYAN; CORK, 1990). A marcha do animal é curta e inconsciente, seguida por fraqueza e por fim decúbito. Nos animais que ainda têm capacidade de ficar em pé pode haver perda acentuada da propriocepção em uma das pernas posteriores. O envolvimento cerebral se manifesta por cabeça pendente, torcicolo e andar em círculos (BLOOD; RADOSTITIS, 1991). As lesões microscópicas são meningoencefalomielite e desmielinização (CORK et al., 1974; NORMAN; SMITH 1983; GONZALEZ et al., 1987; CUTLIP et al., 1988; CONSTABLE et al., 1996; CALLADO; CASTRO; TEIXEIRA, 2001). As lesões macroscópicas geralmente não ocorrem, podendo ocasionalmente haver áreas focais de coloração marrom-clara na substância cinzenta da medula oblonga e medula espinhal.

2.6 ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

As alterações histopatológicas observadas em casos iniciais de artrite foram caracterizadas por proliferação da membrana sinovial, com desenvolvimento de projeções das vilosidades sinoviais para o lúmen da articulação, associadas a uma resposta inflamatória, com intensa infiltração de linfócitos, macrófagos e células plasmáticas, principalmente entre as vilosidades, na região perivascular. Nas formas crônicas de artrites as lesões foram caracterizadas pela necrose de estruturas colagenosas, incluindo a cápsula articular, tendões, bainhas tendinosas, ligamentos e bolsas serosas. As células inflamatórias nesses tipos de lesões, na maioria das vezes, apresentariam organização ao redor de centros germinativos, onde as células plasmáticas seriam predominantes. Lesões mais severas se manifestariam apresentando necrose extensa, com mineralização das bridas necróticas, com subsequente fibrose (ADAMS; CRAWFORD; KLEVJER-ANDERSON, 1980; CRAWFORD et al., 1980; NARAYAN; CORK, 1990).

As alterações patológicas no sistema nervoso foram consideradas como oriundas de encefalomielite desmielinizante, onde, entre as lesões microscópicas se incluíam: acúmulo perivascular de células mononucleares; desmielinização na região subependimal; aumento de astrócitos da neuroglia e meningite mononuclear (CORK et al., 1974; CORK, 1976; CRAWFORD; ADAMS, 1981). Os focos inflamatórios eram predominantemente compostos por macrófagos (NARAYAN; CORK, 1990). Durante a fase aguda da doença, foi descrita na constituição celular do líquido cefalorraquidiano a ocorrência de pleocitose, atingindo-se valores iguais a 100.000 células mononucleares por mm^3 de líquido. Ainda, foram observadas, nesses casos, lesões, caracterizadas por acúmulo perivascular de células mononucleares, que se aprofundando poderiam atingir até o parênquima, sendo a inflamação acompanhada pela destruição da mielina e proliferação das células da neuroglia. Nos estágios mais avançados as células inflamatórias se organizariam em centros germinativos ou acúmulos focais de células da glia (NARAYAN; CORK, 1990).

A mastite intersticial endurecida causada pelo vírus da Artrite-encefalite dos Caprinos foi caracterizada como inflamação não supurativa, com infiltração difusa de células mononucleares, no parênquima glandular. As lesões se constituiriam de

intensa hiperplasia linfocitária, que em casos crônicos se tornariam nódulos linfóides e muitos desses nódulos se localizariam em áreas adjacentes aos dutos lactíferos (PÉTURSSON et al., 1992). Anteriormente, já fora descrito que as células inflamatórias eram do mesmo tipo que as observadas nas articulações acometidas por artrite, determinadas pela ação deletéria do vírus em questão, ou seja, eram linfócitos e macrófagos (NARAYAN; CORK, 1990).

Em casos de pneumonia intersticial causada pelo vírus da Artrite-encefalite dos Caprinos durante a realização de necropsias, os pulmões estavam completamente colabados, densos, apresentando na superfície áreas de coloração cinza, firme à palpação. Ao corte dos pulmões não se constatava a presença de exsudato. Além do mais, nesses casos, não se descreveram alterações na pleura, porém os linfonodos do mediastino estavam aumentados de volume (SIMS; HALE; McCORMICK, 1983). A pneumonia intersticial progressiva, causada pela infecção do vírus da Artrite-encefalite dos Caprinos, poderia afetar tanto os lobos caudais, como os crânio-ventrais. Do ponto de vista histopatológico, as lesões se caracterizariam por: infiltração linfocitária focal e difusa, dos septos alveolares; acúmulo de material eosinofílico no interior dos alvéolos pulmonares; adelgaçamento do septo alveolar e epitelização alveolar (SIMS; HALE; McCORMICK, 1983; ELLIS; ROBINSON; WILCOX, 1988; NARAYAN; CORK, 1990). Pode-se observar grande proliferação de pneumócitos do tipo II e acúmulo de substância surfactante no interior dos alvéolos, fatos que caracterizariam a pneumonia intersticial crônica (ELLIS; ROBINSON; WILCOX, 1988).

2.7 DIAGNÓSTICO

Os animais infectados pelo vírus da CAE nem sempre apresentam alterações clínicas evidentes, por isso estabeleceu-se ser importante que o diagnóstico seja baseado nos antecedentes e no histórico, e, no exame físico do doente, suspeitando-se quando do aparecimento de sinais clínicos relacionados com artrite, mastite, pneumonia ou encefalite. A confirmação é realizada por meio de exames

laboratoriais, principalmente, nas provas soro-imunológicas para detecção de anticorpos virais (CRAWFORD; ADAMS, 1981).

Nos animais que apresentam sinais clínicos, deve-se atentar para realizar o diagnóstico diferencial com outras enfermidades. O diferencial da forma articular deve ser feito com Micoplasmose, Clamidiose, traumas ósteo-articulares e outras causas bacterianas como *Staphylococcus sp* e *Streptococcus sp*. Enquanto que o diferencial da forma nervosa deve ser feito com Listeriose, traumatismos, Polioencefalomalácia, Toxoplasmose, Deficiência de cobre e Scrapie.

A avaliação laboratorial da infecção pelo vírus da CAE pode ser feita por técnicas diretas ou indiretas. A detecção direta da presença do vírus pode ser realizada tanto pelo isolamento em cultura celular e evidênciação do vírus em microscopia eletrônica e da hibridização in situ. Por outro lado, o diagnóstico direto da infecção, pelo isolamento e identificação do agente não é rotineiramente empregado por ser demorado e bastante dispendioso. Alternativamente, tem-se utilizado, em condições ainda experimentais, porém com grandes possibilidades de uso rotineiro, a reação em cadeia de polimerase (PCR), para amplificação do DNA pró-viral ou do DNA sintetizado in vitro pela RT (RT-PCR), a partir do RNA viral (KNOWLES, 1997).

A determinação indireta da infecção pelo vírus da CAE se faz pela detecção da presença de anticorpos por técnicas soro-imunológicas como: imunodifusão em gel de ágar (IDGA); ensaio imunoenzimático (ELISA); imunofluorescência indireta (IFI) e “Western Blot” (REISCHAK, 2000). Devido à praticidade na colheita das amostras e ao custo reduzido, da realização das provas diretas, os métodos sorológicos foram amplamente utilizados para auxiliar o diagnóstico da infecção pelo vírus da CAE.

Para o diagnóstico sorológico, o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) é o recomendado pela OIE (2004), por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas. Este método é a forma diagnóstica mais utilizada em todo mundo, principalmente em programas de controle da doença que já são empregados em vários países (MOOJEN, 2001). Além da fácil aplicabilidade, o IDGA tem alta especificidade o que acaba credenciando-o para a realização dos diagnósticos de triagem nos programas de controle da enfermidade (VAREA et al.,

2001). Entretanto, devido a maior sensibilidade e possibilidade de quantificação e automação, vários ensaios imunoenzimáticos têm sido desenvolvidos para pesquisa de anticorpos séricos, usando-se antígenos CAEV (SCHROEDER; OLIVER; CATHCART, 1985; ARCHAMBAULT et al., 1988; HECKERT et al., 1992; CASTRO, 1998), Visna/maedi (HOUWERS; GIELKENS; SCHAAKE, 1982; VITU et al., 1982; HOUWERS; SCHAAKE, 1987; ZANONI; KRIEG; PETERHANS, 1989; CASTRO, 1998), ou proteína recombinante de CAEV (RIMSTAD et al., 1994; CLAVIJO; THORSEN, 1995; CASTRO, 1998) ou de Visna/maedi (KWANG et al., 1995; CASTRO, 1998). O uso de proteínas recombinantes tem causado problemas de resultados falso positivos, o que tem resultado na substituição desse tipo de antígeno pelos do vírus completo (ZANONI et al., 1994).

Também foi adaptado um teste ELISA para pesquisa de anticorpos no leite ou colostro, sem grandes vantagens em relação aos testes com soros (MOTHA; RALSTON, 1994). Adams et al. (1980), em pesquisa delineada para avaliar a resposta imune de cabras infectadas experimentalmente com o vírus da CAE, compararam os resultados obtidos pelas técnicas de IDGA e ELISA, verificando que após o aparecimento dos anticorpos antivírus da CAE, estes aumentavam rapidamente e que ambos os testes empregados puderam detectar os resultados positivos ao mesmo tempo. Embora tivesse existido boa correlação, entre os dois testes empregados, os pesquisadores consideraram o ELISA mais sensível. Os valores de sensibilidade e especificidade obtidos por Lara (2002) para o teste de ELISA, concordaram com os relatados por Heckert et al. (1992), que obtiveram 98,3% e 97,9%, respectivamente para sensibilidade e especificidade. Tanto o ELISA, como a IFI, utilizadas para a detecção de anticorpos antivírus da CAE, demonstraram concordância nos resultados que estimaram a sensibilidade, especificidade e concordância, quando contrastadas com a prova de IDGA, considerada como teste de referência, podendo ser utilizadas em levantamentos clínico-epidemiológicos para determinação das prevalências da doença e/ou da infecção determinada pelo vírus da CAE.

Devido à restrição da expressão gênica, ou durante a fase precoce da infecção, vários animais infectados por LVPR são soronegativos por períodos bastante variados. Nesses casos a PCR tem se apresentado como potencial alternativa na identificação de animais com sorologia negativa ou dúbia (RIMSTAD

et al., 1993; CHEBLOUNE et al., 1996). Vários sistemas, com iniciadores derivados das sequências dos genes *gag* ou *pol*, foram desenvolvidos para detecção de DNA pró-viral ou RNA viral em leucócitos, células do leite, de lavado brônquio-alveolar do líquido sinovial (REDDY; SAPP; HENEINE, 1993; RIMSTAD et al., 1993; BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995; CHEBLOUNE et al., 1996; RUSSO et al., 1997; CASTRO, 1998). Como alternativa para aumentar a quantidade do produto amplificado e permitir sua visualização pela coloração com brometo de etídio, tem-se usado iniciadores internos à região inicialmente amplificada (BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995), pois geralmente os produtos amplificados só são detectados após hibridização com sonda específica do fragmento do gene que se deseja amplificar (REDDY; SAPP; HENEINE, 1993; RIMSTAD et al., 1993; BARLOUGH et al., 1994; LEROUX et al., 1995; CHEBLOUNE et al., 1996; RUSSO et al., 1997; CASTRO, 1998). Outro método de detecção de ácidos nucleicos virais, porém de uso limitado, é a hibridização *in situ* (BRODIE et al., 1995).

2.8 TRATAMENTO

Não há tratamento específico para a CAE (EAST, 1996), sendo o prognóstico reservado. A maioria que apresenta a sintomatologia são descartados ou sacrificados devido à claudicação, decúbito, perda de peso e queda na produção (REILLY; BAIRD; PUGH, 2002). O mais adequado seria a adoção de medidas profiláticas a fim de evitar ou restringir a disseminação do vírus no plantel de animais.

2.9 PREVENÇÃO E CONTROLE

Atualmente, os programas de controle ou erradicação da infecção por CAEV têm sido adotados em vários países, geralmente de adesão voluntária, baseados no

teste periódico dos animais, com separação ou eliminação dos positivos, e uso de certas práticas de manejo para prevenção da disseminação do agente (OIE, 2004).

Não há tratamento específico para a infecção pelo CAEV e não há vacina, por esses motivos se torna de suma importância sua prevenção, evitando comprar animais de criatórios onde ela ocorre e nunca adquirindo animais com sintomas clínicos. Recomenda-se o controle da infecção realizando os testes sorológicos periódicos (uma a duas vezes por ano) nos caprinos acima de 9 meses de idade (RIBEIRO, 1997). Entretanto, entre os grandes problemas no controle e prevenção da CAE está o diagnóstico realizado de forma tardia, principalmente por não ser uma medida comum ao programa sanitário das propriedades, seja decorrente de desconhecimento, questão cultural ou mesmo por falta de condição do produtor.

Uma vez introduzida a doença no plantel, deve-se adotar algumas medidas para seu controle e posteriormente sua erradicação. A implantação e o acompanhamento do plano de saneamento nas propriedades devem ser realizados por um Médico Veterinário que esteja em contato com um centro que realize o diagnóstico sorológico da CAE (FRANKE, 1998). Segundo Garcia (1993), em primeiro lugar deve ser feito um levantamento da situação do rebanho por meio de exames sorológicos. Em casos de prevalência baixa de animais soropositivos (5 – 10 %), recomenda-se a erradicação do problema com o abate desses animais. Em uma prevalência mais alta (acima de 10%) pode-se optar pela manutenção dos animais de elevado valor zootécnico, desde que sejam identificados com uma marca de fácil visualização. É necessário adotar um cuidado especial com os animais recém nascidos em criações onde ocorre a CAE, pois como visto anteriormente o colostro é a principal via de transmissão. Desta forma, o cabrito não deve mamar na mãe sendo separado logo após o parto e assim, criado livre da infecção (BLOOD; RADOSTITIS et al., 1991). Segundo Ribeiro (1997), o colostro da cabra nunca deve ser fornecido cru, há necessidade de tratá-lo termicamente aquecendo-o a 56°C por uma hora. Também se pode utilizar colostro de outras espécies ou sucedâneo de colostro e colostro em pó. O colostro de outras espécies como, por exemplo, a bovina certamente não transmite a CAE, porém pode transmitir doenças típicas de bovinos como a brucelose e tuberculose. Além disso, devemos estar cientes de que a transmissão de imunidade é menos eficiente. O sucedâneo de colostro deve ser preparado com sangue de animal comprovadamente sadio, caso contrário este irá

disseminar doenças para os cabritos. Existe também a possibilidade de formar um banco de colostro, onde as cabras fornecedoras devem ser testadas pela técnica de PCR a fim de confirmar a inexistência de anticorpos para a CAE.

Para Ribeiro (1997), a formação de dois rebanhos, um com caprinos positivos e outro com negativos, mantidos separadamente, e a eliminação gradativa dos caprinos afetados é uma medida eficaz no controle da infecção. Os cabritos negativos devem ficar permanentemente isolados por uma faixa de no mínimo 1,8 m de largura com relação aos caprinos soropositivos. Não se deve permitir que os animais compartilhem comedouros e bebedouros. Cabras soro negativas devem ser montadas por bodes CAE negativos (SMITH, 1993). Recomenda-se ter cuidados especiais com as agulhas, seringas e materiais cirúrgicos que devem ser criteriosamente esterilizados dando preferência a materiais descartáveis. Quando não possível a utilização desses, é necessário desinfetá-los entre o uso de um animal e outro. Materiais como canivetes e tatuadores devem ser mergulhados em água fervente antes de serem utilizados em outros animais. Para Garcia (1993) uma linha de ordenha deve ser instituída, pois, embora remota, há a possibilidade de transmissão da CAE, assim devemos ordenhar primeiro os animais negativos e por fim os animais positivos. Por último, se deve levar em conta a presença da CAE no ambiente uterino, visto que pode ocorrer transmissão da CAE de matrizes portadoras do vírus para suas crias durante a prenhez ou no peri-parto. Assim, a separação das crias logo após o nascimento e o uso dos métodos de controle restringindo leite e colostro para as crias pode não ser 100% efetivos, o que explicaria a persistência do vírus nos rebanhos onde são seguidos rigorosos programas de controle da CAE (ANDRIOLI et al., 2006).

Segundo Santa Rosa (1996), o tempo necessário para eliminar a doença do rebanho depende da pressão que se estabelece no programa de controle empregado. Quando o rebanho já está praticamente limpo, mas ainda possui cabras soro positivas comprovadamente superiores, cujo material genético é realmente de grande importância, uma alternativa é a inclusão desses animais em um programa de transferência de embriões, desde que possam permanecer isolados do rebanho (RIBEIRO, 1997) já que a CAE parece não ser transmitida pela transferência de embriões (ALI AL AHMAD et al., 2012).

Segundo Franke (1998), o criador de caprinos pode desempenhar um importante papel no controle da disseminação da CAE. Para isso, é necessário que ele incentive a sua associação a promover discussões sobre este tema, convidando pesquisadores da área e, juntos, elaborarem propostas de planos regionais de controle. Outra forma de colaboração dos caprinocultores seria a de exigirem o exame sorológico da CAE na inscrição em exposições, bem como nas transações de compra e venda de animais. Em hipótese alguma os animais positivos poderão ser vendidos a outros criadores. A saída de animais positivos de uma propriedade só poderá ser permitida quando estes se destinarem ao abate. O rebanho é considerado livre da doença quando apresentar pelo menos dois resultados consecutivos de sorologia negativa com intervalo mínimo de seis meses (SANTA ROSA, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS, INSTALAÇÃO E ALIMENTAÇÃO

O experimento foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, protocolado sob o nº2285/2011, aprovado em reunião de 22/06/2011.

O número total de animais utilizados no estudo foi de 19 matrizes e um reprodutor, todos caprinos da raça Saanen com idade variando de um ano e meio a quatro anos. Os animais permaneceram alojados em baias de experimentação no Hospital de Bovinos e Pequenos Ruminantes da FMVZ-USP e foram mantidos isolados, sem qualquer contato com animais externos.

Durante o decorrer do projeto o arraçãoamento foi realizado diariamente com feno coast-cross e ração peletizada e, água e sal mineral *ad libitum*. Para as crias, foi fornecido colostro bovino aquecido e o aleitamento foi realizado durante dois meses utilizando-se leite em pó integral bovino e, após o desmame, arraçãoamento descrito anteriormente.

Os animais foram divididos de acordo com os seguintes grupos:

3.1.1 Grupo experimental 1 (Influência da placenta)

Foram utilizadas cinco fêmeas sabidamente positivas ao lentivírus caprino, as quais foram inseminadas artificialmente com sêmen fresco proveniente de reprodutor sabidamente negativo ao vírus. Estas foram mantidas em baia em conjunto durante gestação, parição e lactação, com colheita de material a cada 15 dias durante o período gestacional e 15 dias pós-parto.

Todas as parições foram acompanhadas a fim de separar a cria imediatamente da cabra, com fornecimento de colostro bovino aquecido e aleitamento com leite em pó bovino integral até os 60 dias de idade.

As crias foram monitoradas durante 12 meses, com esquema de colheita de amostras a zero hora de idade (antes de mamar colostro bovino), 15 dias de idade, 1 mês de idade e a cada 30 dias até completarem 12 meses de idade.

3.1.2 Grupo experimental 2 (Influência do sêmen)

Foram utilizadas seis fêmeas sabidamente negativas ao lentivírus caprino, as quais foram inseminadas artificialmente com sêmen fresco proveniente de reprodutor sabidamente negativo ao vírus com inóculo viral. O inóculo viral foi adicionado ao sêmen fresco com o objetivo de se obter o título infectante para carga viral estabelecido em 10^5 TCID₅₀/mL. O inóculo viral foi obtido pela inserção da amostra padrão CAEV-Cork em monocamadas de células córneas obtidas a partir de explante de caprino negativo após 5ª passagem.

As fêmeas foram mantidas em baia em conjunto durante gestação, parição e lactação, com colheita de material a cada 15 dias durante o período gestacional e 15 dias pós-parto.

Todas as parições foram acompanhadas a fim de separar a cria imediatamente da cabra, com fornecimento de colostro bovino aquecido e aleitamento com leite em pó bovino integral até os 60 dias de idade.

As crias foram monitoradas durante 12 meses, com esquema de colheita de amostras à zero hora de idade (antes de mamar colostro bovino), 15 dias de idade, um mês de idade e a cada 30 dias até completarem 12 meses de idade.

3.1.3 Grupos controles

A fim de se garantir uma maior confiabilidade nos resultados obtidos, foram utilizadas duas fêmeas sabidamente negativas ao lentivírus caprino para serem inseminadas artificialmente com sêmen fresco do mesmo bode reprodutor negativo (Grupo Controle 1); e outras duas fêmeas sabidamente positivas ao lentivírus caprino para serem inseminadas artificialmente com sêmen fresco do mesmo bode reprodutor, porém com o inóculo CAEV-Cork com título infectante para carga viral estabelecido em 10^5 TCID₅₀/mL (Grupo Controle 2).

As fêmeas e crias atenderam mesmo procedimento de manejo e colheita das amostras.

A seguir são sumarizados todos os grupos experimentais em organograma na figura 1.

Figura 1 – Organograma dos grupos experimentais do presente estudo

Fonte: (HASEGAWA, M. Y., 2014).

3.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Os animais primeiramente foram avaliados através do exame clínico geral segundo Dirksen, Gruender e Stoeber (1993). As fêmeas foram submetidas ao protocolo de indução e sincronização de cio com esponjas vaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona¹, administração de 0,3 mL Cloprostenol Sódico² I.M. e 250 UI eCG³ I.M. (TRALDI et al., 2007).

A colheita do sêmen foi realizada com a utilização de eletroejaculador. Toda partida de sêmen utilizada na inseminação das cabras foi testada por nested-PCR para a confirmação da negatividade do ejaculado ao lentivirus caprino.

A inseminação artificial das fêmeas deu-se no momento ideal segundo protocolo utilizado para sincronização hormonal de estro com utilização de sêmen fresco puro.

Para o grupo experimental 2(influência do sêmen) e as duas cabras reagentes ao lentivirus caprino do grupo controle, foi adicionado 100µL de CAEV-Cork padrão cultivado em 900µL de sêmen puro fresco, considerando-se concentração espermática de $480-860 \times 10^6$ spz/mL. A estirpe viral padrão CAEV-Cork foi utilizada por ser proveniente de cultivo celular empregado para a confecção de kit comercial de IDGA. O inóculo viral utilizado no presente estudo foi obtido pela inserção da amostra padrão CAEV-Cork em monocamadas de células córneas obtidas a partir de explante de caprino negativo após 5ª passagem, sendo gentilmente cedido pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

A confirmação da prenhez foi realizada por exame ultrassonográfico após 30 dias IA via retal, com o cuidado de utilizar e trocar a barreira física na probe do aparelho a cada animal examinado, a fim de impedir transmissão iatrogênica do lentivírus caprino.

¹ Progespon® Syntex, Argentina

² Ciosin® Syntex, Argentina

³ Novormon® , Syntex, Argentina

3.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

As amostras foram submetidas ao teste de Imunodifusão em Ágar Gel (IDGA) (ABREU et al., 1998) e Ensaio Imunoenzimático Competitivo (cELISA) (HERRMANN et al., 2003) a fim de detectar anticorpos anti-CAEV nos soros sanguíneos; e nested-PCR para detectar DNA genômico viral em amostras de sangue (GREGORY et al., 2009).

A realização das técnicas empregadas e o processamento das amostras foram efetuados no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, no Laboratório de Pesquisa Clínica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico.

3.3.1 Colheita e processamento dos materiais

As amostras de sangue dos caprinos adultos foram colhidas por venopunção da veia jugular externa, após desinfecção adequada do local, utilizando-se sistema a vácuo com agulhas 21G descartáveis, em tubos de coagulação com gel separador no volume de 7mL. Para os caprinos neonatos, a colheita de sangue foi realizada pelo mesmo acesso venoso, em tubos de coagulação com gel separador no volume de 3mL utilizando-se escalpe com agulha 25G descartável devido ao calibre diminuto da veia jugular externa nos neonatos. Após a colheita, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a coagulação e retração do coágulo e centrifugadas a 3.000g, durante 15 minutos. A seguir, após a centrifugação com a liberação de soro, este era transferido para microtubos identificados estéreis de capacidade para 1,5mL ou 2mL separados em duplicata, sendo, então, mantidos estocados em freezer em temperatura de menos 20°C até o momento da realização das provas.

Ainda foram colhidas amostras de sangue dos caprinos adultos com mesmo acesso venoso e procedimento de colheita em tubos com citrato de sódio no volume

de 2,7mL para adultos e 1,9mL para neonatos. Após colheita de sangue, os tubos foram imediatamente homogeneizados cuidadosamente para o sangue colhido entrar em contato com o anticoagulante e, portanto impedir a formação do coágulo sanguíneo.

3.3.2 Extração de DNA genômico

Realizou-se, em até 24 horas, a extração do material genético das amostras de sangue total com citrato de sódio segundo o protocolo de extração de kit comercial⁴. (SANTOS et al., 2009). Foram incubados 300µL da amostra de sangue total previamente homogeneizado com 20µL de proteinase K e 400µL de tampão de lise. A mistura foi homogeneizada três vezes por aproximadamente 20 segundos utilizando o vórtex com intervalo de 5 minutos cada. Em sequência, a mistura foi transferida para as colunas com filtros e centrifugada a 11.000 g à 21°C por dois minutos descartando-se o filtrado. A seguir foram adicionados 500µL de tampão de lise e centrifugados novamente a 11.000 g à 21°C por dois minutos descartando-se o filtrado. Em uma última lavagem foram adicionados, novamente, 500µL de tampão de lise e centrifugados a 11.000 g à 21°C, porém, agora, por 4 minutos. E finalmente foram adicionados 200µL de tampão de eluição aquecido à 70°C, aguardando um minuto antes de centrifugar a 11.000 g à 21°C por dois minutos. O material da extração (aproximadamente 40µL) foi armazenado a -20°C, até ser utilizado na amplificação.

Para as amostras de sêmen colhidas por eletroejaculação provenientes do bode reprodutor não reagente, o DNA genômico viral foi extraído seguindo protocolo de extração pelo método Fenol/Clorofórmio/Álcool isoamil.

20µL de cada amostra de sêmen foi incubado por 30 minutos a 56°C, em 150µL de TNE (Tris HCl 10mM, EDTA 10 mM e NaCl 10mM, pH 8,0) acrescidos de 20µL de SDS 10%, 10µL de pK (Proteinase K). A seguir foi realizada três lavagens

⁴ GE Healthcare - illustra™ blood genomicPrep Mini Spin (cód. 28-9042-64), Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK

consecutivas com 200µL de Fenol Buffer Saturado, 150 µL de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamil (25:24:10) e 100 µL de Clorofórmio 100% respectivamente, centrifugadas a 12.000 rpm por três minutos cada em temperatura entre 18°C e 22°C. Cerca de 20µL foi aliquoteado do sobrenadante e armazenado a -20°C, até ser utilizado na amplificação.

3.3.3 Prova de imunodifusão em gel ágar (IDGA)

As amostras de soro foram submetidas à técnica usual para esses testes, utilizando o kit comercial⁵.

O teste utiliza antígeno concentrado de sobrenadantes de culturas celulares infectadas com CAEV e soro positivo colhido de animal naturalmente infectado, sendo indicado para detecção de anticorpos anti-p28 em soros de caprinos infectados por CAEV. A técnica baseia-se na migração radial dupla de antígeno e anticorpo, através de agarose a 1% em tampão de base borato. O encontro dos reagentes, em proporções ótimas, leva à formação de conjugados insolúveis que precipitam, sob a forma de uma linha visível.

Para a preparação do gel de agarose, foi aquecido o frasco com o gel fornecido, em forno de micro-ondas até sua total liquefação. Foram distribuídos 14mL em placa de Petri de 90mm de diâmetro. Após esperar 15 minutos em temperatura ambiente para endurecimento do gel, a placa foi colocada em seguida sob refrigeração por 5 minutos. A placa foi retirada e deixada sem tampa a temperatura ambiente por mais 5 minutos e só então a placa foi perfurada de maneira a formar sete poços com auxílio de molde em forma hexagonal. No poço central foi adicionado o antígeno e os seis poços periféricos foram distribuídos de maneira alternada, o soro controle positivo e os soros a serem testados. Os poços destinados ao soro controle e ao antígeno têm 3mm de diâmetro, enquanto os destinados aos soros a serem testados, têm 5mm, todos equidistantes a 2mm. Após remoção dos cilindros formados, os reagentes foram distribuídos nos seis poços de

⁵ Biovetech partida 002, Recife, PE, Brasil.

maneira alternada, 30µL do soro teste e 10µL do soro controle positivo; e 10µL do antígeno no poço central. As placas de Petri permaneceram em atmosfera úmida à temperatura entre 20°C e 25°C, por 48 horas.

A leitura foi feita a partir de 24 horas de incubação, e a definitiva feita após 48 horas. Para a visualização das linhas de precipitação, as placas foram observadas sobre um fundo preto, sob luz indireta.

3.3.4 Prova de ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA)

Para a detecção de anticorpos antivírus da Artrite encefalite caprina pelo teste de ensaio imunoenzimático por competição - cELISA (Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (HERRMANN et al., 2003), as amostras de soro foram submetidas à técnica usual para esses testes, utilizando kit comercial⁶.

Os anticorpos anti-CAEV existentes nos soros das amostras inibem a ligação do anticorpo monoclonal anti-CAEV marcado com peroxidase com o antígeno que reveste os poços da placa. A ligação do conjugado do anticorpo monoclonal é detectada pela adição de substrato de enzima e quantificado por consequente desenvolvimento de cor. Forte desenvolvimento de cor indica pouco ou nenhum bloqueio da ligação do anticorpo monoclonal e, portanto, a ausência de anticorpos anti-CAEV na amostra de soro. Fraco desenvolvimento de cor devido à inibição da ligação do anticorpo monoclonal ao antígeno na fase sólida indica a presença de anticorpos anti-CAEV em amostra de soro.

O teste ELISA foi realizado conforme instruções contidas no manual técnico do fabricante, em placas com 96 poços. Pipetou-se 50µL de controle positivo, 50µL de controle negativo e 50µL de soro sanguíneo que foram testados na placa coberta por antígeno. Em seguida, a placa foi incubada por 60 minutos à temperatura ambiente (21-25°C). Após incubação de uma hora, lavou-se a placa com solução de lavagem 1X por três vezes seguidas. A solução de lavagem foi desprezada e o

⁶ Caprine Arthritis-Encephalitis Vírus Antibody Test Kit cELISA marca: VMRD, PO Box 502, Pullman, WA, USA, cat.: 289-5.

excesso retirado com toalha de papel. Adicionou-se 50µL de conjugado diluído de anticorpo-peroxidase em cada poço e em seguida a placa foi novamente incubada por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Após 30 minutos de incubação, lavou-se a placa com solução de lavagem 1X por três vezes seguidas. A solução de lavagem foi desprezada e o excesso retirado com toalha de papel. Adicionou-se 50µL de solução substrato em cada poço. Incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, e os poços não foram esvaziados. E por último, adicionou-se 50µL de solução de parada em cada poço sem esvaziar os poços. Imediatamente a placa foi lida em um leitor de ELISA. Foi ajustada densidade óptica para comprimento de onda de 630nm.

Validação do teste

A média dos controles negativos deve produzir uma densidade óptica $\geq 0,300$.

A média dos controles positivos deve produzir $\geq 35\%$ de inibição.

Cálculo da porcentagem de inibição (I%):

$I\% = 100 - [(densid. \text{ óptica da amostra} \times 100) \div (média \text{ densid. óptica controle negativo})]$

Interpretação dos Resultados

Se uma amostra teste produzir $\geq 35\%$ de inibição, amostra é positiva.

Se uma amostra teste produzir $< 35\%$ de inibição, amostra é negativa.

3.3.5 Reação em cadeia da polimerase aninhada (nested-PCR)

A técnica molecular de nested-PCR possui o objetivo de aumentar a sensibilidade da PCR amplificando sequencias internas a partir de um trecho específico de DNA anteriormente produzido por uma primeira etapa de amplificação.

Foram usados primers gerados especificamente para um fragmento conservado do gene pol, empregando-se iniciadores externos degenerados situados entre as posições 2198 e 2672, P1: 5'-DSAAGARAAATTARARGG-3' e P2: 5'-ATCATCCATRTATATBCCAAATTG-3' (LEROUX et al., 1995) para amplificar fragmentos de 475pb e, para a amplificação de fragmento mais interno, entre as

posições 2299 e 2576, PN1 5'- GGAAADGCACCYCCACATTG-3' e PN2 5'- CATGGTCCRAYATTATTAGG-3' (GREGORY et al., 2009) com fragmentos de 278pb, onde D = G, A ou T; Y = C ou T; e R = A ou G). O controle negativo foi feito com água DEPC enquanto que o controle positivo foi utilizada a amostra padrão CAEV-Cork.

O DNA pró-viral genômico foi amplificado em um volume total de 50µL contendo uma mistura de reagentes (Storage Buffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM, estabilizadores, 50% (v/v) glicerol; 10X PCR Buffer: 200 mM Tris-HCl (pH8.4), 500 mM KCl; 50 mM MgCl₂; 10 µM cada primer senso e anti-senso; 10 mM mistura de dNTP; 1U enzima DNA polimerase⁷. A amplificação foi feita inicialmente a 95°C por cinco minutos e 35 ciclos de 95°C por 45 segundos para a denaturação, seguido de 55°C por 45 segundos para o pareamento/anelamento dos primers a por fim a 72°C por 45 segundo para extensão das fitas de DNA terminando o ciclo com 72°C por oito minutos e a 4°C até a retirada das amostras. A detecção do produto amplificado será determinada pela corrida eletroforética. Serão submetidos 10 µL dos produtos das reações em eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE (Tris Borato 0,09M e EDTA 0,002M pH 8,0) corados com brometo de etídio (1 µg/mL). As amostras serão coradas, uma a uma, com 2 µL de loading buffer antes de serem aplicadas no gel. Um marcador de peso molecular de 100pb, o controle negativo e o controle positivo serão incluídos no gel. Após a corrida eletroforética desenvolvida a 80V, os géis serão observados em luz ultravioleta com o auxílio de transiluminador e o registro fotográfico será efetuado no fotodocumentador ⁸.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de IDGA, cELISA e nested-PCR foram expressos como porcentagem (%), sendo determinados pelo número total de amostras positivas dividido pelo número total de amostras multiplicado por 100.

⁷ Platinum®Taq DNA Polymerase invitrogen. Itapevi, SP, Brasil, Cat. No. 10966-030.

⁸ Biorad®

As verificações da influência da presença ou não do vírus nos animais monitorados, sobre os resultados obtidos na determinação de anticorpos séricos antivírus da Artrite encefalite caprina por IDGA e cELISA e na detecção do DNA genômico viral por nested-PCR foram analisados tomando-se como base o primeiro momento com resultado positivo.

Foi realizada a comparação do momento do primeiro diagnóstico positivo entre os testes diagnósticos, por grupo. Para tanto, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade para os dados, considerando-se distribuição normal. O teste ANOVA paramétrica foi utilizado para comparar os diferentes testes em cada grupo de animais.

Para a comparação do momento no primeiro diagnóstico positivo entre os diferentes grupos para cada teste diagnóstico, utilizou-se, para testar a normalidade dos dados, o teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando-se distribuição normal. O teste ANOVA paramétrico com o teste post-hoc Tukey foram utilizados para comparar os diferentes grupos de animais para cada teste diagnóstico utilizado.

Para descrevermos a intensidade da concordância entre os testes de IDGA, cELISA e nested-PCR para cada momento analisado, foi utilizada a medida Kappa que é baseada no número de respostas concordantes, ou seja, no número de casos cujo resultado é o mesmo entre os testes. O Kappa é uma medida de concordância interobservador e mede o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso (LANDIS; KOCH, 1977).

A análise estatística foi realizada utilizando-se programa de software SAS.

4 RESULTADOS

Os resultados são mostrados de acordo com os grupos experimentais, e ao final é apresentada a análise estatística dos resultados.

4.1 GRUPO EXPERIMENTAL 1 (INFLUÊNCIA DA PLACENTA)

As fêmeas do grupo experimental, após a sincronização e inseminação artificial com sêmen fresco obtido de macho sabidamente negativo, foram avaliadas quanto à prenhez por ultrassonografia, determinando-se, assim, a data de concepção e estimando-se uma provável data de parto. Ressalta-se que as fêmeas que não emprenharam no primeiro serviço foram sincronizadas novamente até que emprenhassem. A parição foi acompanhada tomando-se os devidos cuidados com as fêmeas e os neonatos e, principalmente, evitando-se que estes mamassem o colostro em suas mães, os quais foram separados logo após o parto. Entretanto, as crias da fêmea “K” mamaram colostro da mãe, sendo todos retirados do estudo. A fêmea “G” também foi retirada das análises, pois morreu devido a Toxemia da Prenhez; mesmo sendo realizada cesárea de emergência, a fêmea e as duas crias não sobreviveram. Com isso, foram inseminadas novamente as cabras “A”, “E” e “F”. A cabra “K” não foi colocada para ser inseminada novamente, pois houve rompimento do músculo gastrocnêmico após dois meses do parto, impossibilitando sua participação no experimento. A cabra “F” emprenhou novamente, e como ela já fora acompanhada na primeira gestação, e novamente nessa segunda vez, as duas gestações foram designadas como “F1” e “F2”, respectivamente.

A tabela 1 apresenta dados referentes às datas de concepção, de parição das fêmeas do grupo 1 juntamente com suas respectivas crias.

Tabela 1 – Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo 1 - São Paulo – 2011 a 2013

Cabra	Data Concepção	Data Parição	Identificação cabrito	Sexo
A	06/11/2011	04/04/2012	01	macho
			02	macho
			03	macho
D	06/11/2011	08/04/2012	04	fêmea
			05	macho
			06	macho
F1	06/11/2011	10/04/2012	07	fêmea
K	06/11/2011	02/04/2012	08	fêmea
			09	macho
C	18/12/2011	21/05/2012	12	macho
			13	macho
E	19/02/2012	24/07/2012	14	fêmea
G	27/04/2012	óbito	-	-
F2	18/10/2012	18/03/2013	16	macho
			17	macho

Fonte: (HASEGAWA, M. Y., 2014).

Sabendo dos imprevistos ocorridos, as fêmeas “A”, “C”, “D”, “E” e “F” foram monitoradas para comporem o grupo experimental 1. E ainda foram acompanhadas duas gestações da cabra “F” denominadas como “F1” e “F2”.

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao monitoramento das fêmeas do Grupo 1 durante período gestacional e 15 dias pós-parto pelas técnicas de IDGA, cELISA e nested-PCR segundo tabelas 2, 3 e 4, respectivamente.

Tabela 2 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pela prova de IDGA - São Paulo – 2011 a 2013

Cabras Grupo1	Tempo de Gestação em dias										15 dias puerpério
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
A	+	+	+	n.r.	+	+	+	+	+	+	+
C	n.r.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D	+	-	+	n.r.	+	+	+	+	+	+	+
E	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
F1	+	+	+	n.r.	+	+	+	+	+	+	+
F2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo;

-: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Tabela 3 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pela prova de cELISA - São Paulo – 2011 a 2013

Cabras	Tempo de Gestação em dias										15 dias puerpério
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
A	+	+	+	n.r.	+	+	+	+	+	+	+
C	n.r.	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
D	+	+	+	n.r.	+	+	+	+	+	+	+
E	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F1	+	+	+	n.r.	+	+	+	+	+	+	+
F2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Tabela 4 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pela prova de nested-PCR - São Paulo – 2011 a 2013

Cabras Grupo1	Tempo de Gestação em dias										15 dias puerpério
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
A	-	-	-	n.r.	-	-	-	+	-	-	-
C	n.r.	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
D	+	-	+	n.r.	-	+	+	-	-	-	+
E	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
F1	-	-	+	n.r.	-	-	-	-	-	-	+
F2	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

De um total de 62 amostras analisadas, 54 amostras (87,10%) são positivas pela prova de IDGA, 55 amostras (88,71%) positivas para a prova de cELISA e 16 amostras (25,81%) positivas para a prova de nested-PCR.

A cabra “E” apresentou quatro de 11 momentos analisados como resultado positivo para a técnica de IDGA, entretanto para a técnica de cELISA todos os momentos analisados resultaram positivos.

A cabra “C”, porém, apresentou resultado positivo para todos os momentos analisados pela técnica de IDGA e apenas três de 11 momentos analisados como resultado positivo para a técnica de cELISA, caracterizando um comportamento inverso ao da cabra “E”.

Observando-se os resultados pela técnica de nested-PCR, em todas as cabras foi detectada positividade em pelo menos um momento analisado. Com

maior frequência de positividade observada nos momentos analisados, as cabras “C” e “D” obtiveram cinco de 10 momentos com resultados positivos pela técnica.

A seguir é apresentada a tabela 5 mostrando resultados condensados das três provas aplicadas nas amostras das fêmeas do Grupo 1.

Tabela 5 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 1 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2011 a 2013

Cabras Grupo 1			A	C	D	E	F1	F2
Tempo de Gestação em dias	15	IDGA	+	n.r.	+	-	+	+
		cELISA	+	n.r.	+	+	+	+
		nested-PCR	-	n.r.	+	-	-	-
	30	IDGA	+	+	-	+	+	+
		cELISA	+	-	+	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-
	45	IDGA	+	+	+	-	+	+
		cELISA	+	-	+	+	+	+
		nested-PCR	-	-	+	+	+	-
	60	IDGA	n.r.	+	n.r.	-	n.r.	+
		cELISA	n.r.	-	n.r.	+	n.r.	+
		nested-PCR	n.r.	+	n.r.	-	n.r.	-
75	IDGA	+	+	+	-	+	+	
	cELISA	+	-	+	+	+	+	
	nested-PCR	-	-	-	+	-	-	
90	IDGA	+	+	+	-	+	+	
	cELISA	+	-	+	+	+	+	
	nested-PCR	-	-	+	-	-	-	
105	IDGA	+	+	+	-	+	+	
	cELISA	+	+	+	+	+	+	
	nested-PCR	-	+	+	-	-	-	
120	IDGA	+	+	+	-	+	+	
	cELISA	+	+	+	+	+	+	
	nested-PCR	+	-	-	-	-	+	
135	IDGA	+	+	+	+	+	+	
	cELISA	+	-	+	+	+	+	
	nested-PCR	-	+	-	-	-	-	
150	IDGA	+	+	+	+	+	+	
	cELISA	+	-	+	+	+	+	
	nested-PCR	-	+	-	-	-	-	
15 dias puerpério		IDGA	+	+	+	+	+	
		cELISA	+	+	+	+	+	
		nested-PCR	-	+	+	+	-	

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Idade	Prova diagnóstica	(conclusão)											
		Identificação Cabritos											
		01	02	03	04	05	06	07	12	13	14	16	17
6 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
12 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M. Y., 2014).

Todos os cabritos nascidos das fêmeas do Grupo 1 apresentaram resultado negativo em todos os momentos analisados para as provas de IDGA e cELISA. Os cabritos 04, 05, 06, 07, 16 e 17 apresentaram resultado positivo para nested-PCR em um ou demais momentos. Das 168 amostras totais analisadas dos cabritos do grupo 1, 12 amostras (7,14%) apresentaram banda positiva para a técnica de nested-PCR.

A seguir o gráfico 2 mostra o número de cabritos do grupo 1 com resultados positivos para as provas diagnósticas durante período de vida analisado.

			(conclusão)										
Cabras			H	I	J	N	O	P	Q	R	S	T	U
Dias pós-IA com CAEV	45	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		cELISA	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	IDGA	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		cELISA	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	IDGA	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		cELISA	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	90	IDGA	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
		cELISA	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	105	IDGA	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
		cELISA	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	120	IDGA	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
		cELISA	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	135	IDGA	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
		cELISA	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	150	IDGA	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
		cELISA	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	165	IDGA	n.r.	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
		cELISA	n.r.	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		nested-PCR	n.r.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	180	IDGA	n.r.	n.r.	+	-	+	-	+	-	-	-	+
		cELISA	n.r.	n.r.	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		nested-PCR	n.r.	n.r.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	195	IDGA	n.r.	n.r.	+	-	+	-	+	-	-	-	+
		cELISA	n.r.	n.r.	+	-	+	+	+	+	-	+	+
		nested-PCR	n.r.	n.r.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	210	IDGA	n.r.	n.r.	+	-	+	-	+	-	-	-	+
		cELISA	n.r.	n.r.	+	-	+	+	+	+	+	+	+
		nested-PCR	n.r.	n.r.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Com relação ao potencial de transmissibilidade do sêmen com CAEV, nove fêmeas de 11 apresentaram níveis de anticorpos anti-CAEV detectáveis pelas provas de IDGA e cELISA. As fêmeas “O” e “Q” apresentaram resultado positivo pela

prova de cELISA aos 30 dias após IA, sendo detectadas mais precocemente que as outras fêmeas. De um total de 158 amostras analisadas para cada técnica diagnóstica, 90 (56,96%) foram positivas para cELISA, 38 (24,05%) foram positivas para IDGA e zero para nested-PCR. Embora a fêmea “P” tenha apresentado resultados positivos pelo teste diagnóstico cELISA nos momentos 105, 150, 165, 180, 195 e 210 dias após IA, o teste de IDGA por sua vez não detectou Ac anti-CAEV em nenhum momento analisado para a referida cabra. Somente as fêmeas “H” e “N” apresentaram resultados negativo para todas as técnicas diagnósticas empregadas em todos os momentos analisados. Nenhuma fêmea apresentou banda positiva em gel de eletroforese referente ao nested-PCR.

O número de fêmeas, que apresentaram resultado positivo pela prova de cELISA, foi, em todos os momentos, exceto 15 dias após IA, superior ao número de fêmeas com resultado positivo pela técnica de IDGA.

O gráfico 3 apresenta o número de fêmeas inseminadas com inóculo viral CAEV com resultado positivo para as provas diagnósticas realizadas durante período de monitoramento.

Gráfico 3 - Número de fêmeas com resultado positivo nas provas de IDGA, cELISA e Nested-PCR após IA com CAEV – São Paulo – 2012 a 2013

Fonte: (HASEGAWA, M. Y., 2014).

De 11 fêmeas apenas seis tiveram prenhez confirmada por exame ultrassonográfico 30 dias pós-inseminação. As seis fêmeas prenhes (“H”, “N”, “O”, “P”, “Q” e “T”), constituíram o Grupo Experimental 2. Todas as cabras prenhes foram submetidas a tratamento preventivo de Toxemia da Gestação com administração de propilenoglicol via oral durante terço final de gestação. Mesmo assim, a cabra “H” apresentou sinais clínicos da Toxemia da Gestação, aos 146 dias de prenhez. Foi realizada cesárea em caráter emergencial e foram retiradas quatro crias, sendo que somente uma sobreviveu (cabrita nº 29). A cabra “H” morreu três dias após cirurgia, motivo o qual não há amostra colhida do referido animal no momento 15 dias de puerpério, 165, 180, 195 e 210 dias pós-IA. A fêmea “I” foi acompanhada até 165 dias após IA.

A tabela 8 apresenta dados referentes às datas de concepção, de parição das fêmeas do grupo 2 juntamente com suas respectivas crias e sexo das mesmas.

Tabela 8 - Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo 2 - São Paulo – 2012 a 2013

Cabras Grupo 2	Data Concepção	Data Parição	Cria	Sexo
O	03/11/2012	03/04/2013	18	macho
			19	fêmea
T	11/11/2012	12/04/2013	20	macho
			21	macho
P	11/11/2012	13/04/2013	22	macho
			23	fêmea
Q	12/11/2012	14/04/2013	24	macho
N	19/11/2012	27/04/2013	27	macho
			28	macho
H	29/12/2012	26/05/2013	29	fêmea

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao monitoramento das fêmeas do Grupo 2 durante período gestacional e 15 dias pós-parto pelas técnicas de IDGA, cELISA e nested-PCR segundo tabelas 9, 10 e 11, respectivamente.

Tabela 9 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 2 pela prova de IDGA - São Paulo – 2012 a 2013

Cabras Grupo 2	Tempo de Gestação em dias										15 dias puerpério
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
T	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Tabela 10 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 2 pela prova de cELISA - São Paulo – 2012 a 2013

Cabras Grupo 2	Tempo de Gestação em dias										15 dias puerpério
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
Q	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Tabela 11 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo 2 pela prova de nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2013

Cabras Grupo 2	Tempo de Gestação em dias										15 dias puerpério
	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.
N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Q	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Das seis fêmeas prenhes que foram acompanhadas, quatro (66,67%) apresentaram Ac anti-CAEV detectáveis pelas provas de IDGA e cELISA. Nenhuma das seis prenhes resultaram positivo para nested-PCR durante período de monitoramento.

De um total de 65 amostras analisadas para cada técnica diagnóstica, 32 (49,23%) foram positivas para cELISA, 12 (18,46%) foram positivas para IDGA e zero para nested-PCR.

Todas as fêmeas que apresentaram resultados positivos pela prova de IDGA concomitantemente apresentaram resultado positivo para a prova de cELISA. Entretanto nem todos os momentos com positividade para cELISA houve concomitância com IDGA.

Das quatro fêmeas positivas ao cELISA, dois (animais “O” e “Q”) apresentaram positividade a partir de 30 dias pós IA e mantiveram-se positivos até 15 dias de puerpério. A fêmea “T” mostrou positividade a partir de 45 dias de gestação e manteve resultado positivo até 15 dias de puerpério. E a cabra “P” não demonstrou positividade contínua como as fêmeas “O”, “Q” e “T”; somente apresentou resultados positivos para cELISA nos momentos 105 e 150 dias de gestação e 15 dias de puerpério.

Para a técnica de IDGA, somente uma cabra (“Q”) apresentou positividade contínua a partir de 105 dias de gestação até 15 dias de puerpério. A cabra “T” apresentou resultado positivo para IDGA somente aos 135 dias de gestação. A fêmea “O” apresentou resultado positivo para IDGA aos 60, 75 e 90 dias de gestação e depois aos 135, 150 dias de gestação e 15 dias de puerpério.

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao monitoramento das crias do Grupo 2 durante período de um ano pelas técnicas de IDGA, cELISA e nested-PCR segundo tabela 12.

Tabela 12 - Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo 2 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2013 a 2014

(continua)

Idade	Prova diagnóstica	Identificação Cabritos									
		18	19	20	21	22	23	24	27	28	29
Zero hora	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
15 dias	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 mês	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-

(conclusão)											
Idade	Prova diagnóstica	Identificação Cabritos									
		18	19	20	21	22	23	24	27	28	29
2 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
3 meses	IDGA	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
4 meses	IDGA	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
7 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
8 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
9 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
10 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	+	-	n.r.	-
11 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
12 meses	IDGA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	-	-	-	-	-	-	n.r.	-

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

De 133 amostras totais analisadas para cada técnica diagnóstica, 15 (11,28%) amostras resultaram positivas na nested-PCR, sete (5,26%) amostras positivas no IDGA e zero positivos em cELISA.

O cabrito 28 apresentou maior número de resultados positivos, sendo seis totais: três para nested-PCR e três para IDGA. Os cabritos 18, 23 e 27 apresentaram, respectivamente, dois para nested-PCR e um para IDGA; três para nested-PCR; dois para IDGA e um para nested-PCR. Os cabritos 19 e 24

apresentaram, respectivamente, um para IDGA e um para nested-PCR; e dois para nested-PCR. Os cabritos 20, 21 e 22 apresentaram apenas um resultado positivo para nested-PCR. A cabrita 29 não apresentou resultado positivo em nenhuma das técnicas.

O cabrito 28 foi monitorado apenas até os cinco meses de idade. A partir dos quatro meses de idade, o animal apresentou vários episódios de apatia, hipotonia ruminal, hipoglicemia e hiporexia, havendo a necessidade de se oferecer maior quantidade de capim fresco e farelo de soja e realizar transfaunação e fluidoterapia com solução glicosada. Resultados de hemograma e bioquímica sanguínea não indicaram anormalidades. Aos cinco meses de idade, o animal passou por um procedimento de ruminotomia a fim de esclarecer a suspeita de corpo estranho. Foram encontrados uma grande massa de bolo ruminal mais espessa, endurecida e ressecada e alguns corpos estranhos como barbante plástico. O animal veio a óbito aproximadamente sete horas após o término da cirurgia. O resultado da necropsia indicou como *causa mortis* colapso respiratório com edema pulmonar severo e marcante atrofia hepatocitária devido o período de desnutrição.

Abaixo o gráfico 4 mostra o número de cabritos do grupo 2 com resultados positivos para as provas diagnósticas durante período de vida analisado.

Gráfico 4 - Número de cabritos do Grupo 2 com resultado positivo nas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR – São Paulo – 2013 a 2014

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Houve maior concentração de resultados positivos para os cabritos do grupo 2 no terço inicial do período monitorado. O momento em que apresentou maior número de resultados positivos para os cabritos do grupo 2 foi aos três de meses de idade com dois resultados de IDGA (cabritos 18 e 28) e seis resultados de nested-PCR (cabritos 18, 19, 20, 21, 23 e 28) positivos.

4.3 GRUPO CONTROLE 1 (FÊMEA LIVRE DE CAEV + SÊMEN LIVRE DE CAEV)

Inicialmente as fêmeas negativas ao vírus (“B” e “L”) foram emprenhadas com sêmen proveniente do mesmo bode negativo ao vírus utilizado nos grupos experimentais 1 e 2. As partições foram acompanhadas e a tabela 13 apresenta dados referentes às datas de concepção, de partição das fêmeas do grupo controle juntamente com suas respectivas crias.

Tabela 13 - Datas da concepção, de partição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo Controle 1 - São Paulo – 2011 a 2013

Grupo Controle 1	Data Concepção	Data Partição	Nº Cabrito	Sexo
L1	18/12/2011	18/05/2012	10	macho
			11	macho
B	01/06/2012	05/11/2012	15	fêmea
L2	25/03/2013	27/08/2013	31	macho

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

A seguir é apresentada a tabela 14 mostrando resultados condensados das três provas aplicadas nas amostras das fêmeas do Grupo Controle 1.

Tabela 14 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo Controle 1 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2011 a 2013 (continua)

Cabras Grupo Controle 1			B	L1	L2
Tempo de Gestação em dias	15	IDGA	-	n.r.	-
		cELISA	-	n.r.	-
		nested-PCR	-	n.r.	-
	30	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	45	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	60	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-

			(conclusão)		
Cabras Grupo Controle 1			B	L1	L2
Tempo de Gestação em dias	75	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	90	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	105	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	120	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	135	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
	150	IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-
15 dias puerpério		IDGA	-	-	-
		cELISA	-	-	-
		nested-PCR	-	-	-

n.r. = não realizada colheita de amostra.

-: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao monitoramento das crias do Grupo Controle 1 durante período de um ano pelas técnicas de IDGA, cELISA e nested-PCR segundo tabela 15.

Tabela 15 - Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo Controle 1 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2014

		(continua)			
Idade	Prova diagnóstica	Identificação Cabritos			
		10	11	15	31
Zero hora	IDGA	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-
15 dias	IDGA	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-
1 mês	IDGA	-	-	-	-
	cELISA	-	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-	-
2 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
3 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-

Idade	Prova diagnóstica	(conclusão)			
		Identifica�o Cabritos			
		10	11	15	31
4 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
5 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
6 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
7 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
8 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
9 meses	IDGA	-	-	n.r.	-
	cELISA	-	-	n.r.	-
	nested-PCR	-	-	n.r.	-
10 meses	IDGA	-	-	n.r.	n.r.
	cELISA	-	-	n.r.	n.r.
	nested-PCR	-	-	n.r.	n.r.
11 meses	IDGA	-	-	n.r.	n.r.
	cELISA	-	-	n.r.	n.r.
	nested-PCR	-	-	n.r.	n.r.
12 meses	IDGA	-	-	n.r.	n.r.
	cELISA	-	-	n.r.	n.r.
	nested-PCR	-	-	n.r.	n.r.

n.r. = no realizada colheita de amostra;

-: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

4.4 GRUPO CONTROLE 2 (FMEA COM CAEV + SMEN COM CAEV)

As fmeas positivas ao CAEV (“J” e “U”) foram inseminadas com mesmo smen utilizado no grupo experimental 2, em que era proveniente de bode negativo ao CAEV, porm inoculado com cultivo de clula infectado com CAEV Cork. O ttulo infectante foi o mesmo utilizado para o grupo experimental 2, ou seja, em 10^5 TCID₅₀/mL. As parties foram acompanhadas e a tabela 16 apresenta dados referentes s datas de concepo, de partio das fmeas do grupo controle juntamente com suas respectivas crias.

Tabela 16 - Datas da concepção, de parição, identificação e sexo das crias referente ao Grupo Controle 2 - São Paulo – 2012 a 2013

Grupo Controle 2	Data Concepção	Data Parição	Nº Cabrito	Sexo
J	15/11/2012	14/04/2013	25	macho
			26	macho
U	29/12/2012	26/05/2013	30	fêmea

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

A seguir é apresentada a tabela 17 mostrando resultados condensados das três provas aplicadas nas amostras das fêmeas do Grupo Controle 2.

Tabela 17 - Resultado do período de monitoramento das fêmeas do Grupo Controle 2 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2012 a 2013

Cabras Grupo Controle 2			J	U
Tempo de Gestação em dias	15	IDGA	-	-
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	30	IDGA	-	-
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	45	IDGA	+	-
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	60	IDGA	+	-
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	75	IDGA	+	-
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	90	IDGA	+	+
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	105	IDGA	-	+
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	120	IDGA	+	+
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	135	IDGA	+	+
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
	150	IDGA	+	+
		cELISA	+	+
		nested-PCR	-	-
15 dias puerpério		IDGA	+	n.r.
		cELISA	+	n.r.
		nested-PCR	-	n.r.

n.r. = não realizada colheita de amostra.

+: positivo; -: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

O gráfico 5 apresenta o número de fêmeas do Grupo Controle 2 com resultado positivo para as provas diagnósticas realizadas durante período de monitoramento.

Gráfico 5 - Número de fêmeas do Grupo Controle 2 com resultado positivo para IDGA, cELISA e nested-PCR durante gestação e puerpério – São Paulo – 2012 a 2013

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

As fêmeas reagentes ao lentivírus caprino inseminadas com o inóculo viral apresentaram 13 (61,90%) das amostras positivas para IDGA, 21 (100%) para cELISA e nenhuma amostra para nested-PCR

A fêmea “U” morreu logo após parto devido a dificuldades ocorridas durante parição, portanto não houve amostra referente aos 15 dias de puerpério.

Os resultados apresentados a seguir são referentes ao monitoramento das crias do Grupo Controle 2 durante período de um ano pelas técnicas de IDGA, cELISA e nested-PCR segundo tabela 18.

Tabela 18 - Resultado do período de monitoramento das crias do Grupo Controle 2 pelas provas de IDGA, cELISA e nested-PCR - São Paulo – 2013 a 2014

Idade	Prova diagnóstica	Identificação Cabritos		
		25	26	30
Zero hora	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
15 dias	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
1 mês	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
2 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
3 meses	IDGA	-	-	+
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
4 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
5 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
6 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
7 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	+	-	-
8 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
9 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
10 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
11 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-
12 meses	IDGA	-	-	-
	cELISA	-	-	-
	nested-PCR	-	-	-

+: positivo;

-: negativo.

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Somente a cabrita 30 apresentou positividade para IDGA aos três meses e o cabrito 25 para nested-PCR aos sete meses de idade durante período de acompanhamento.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.5.1 Comparação do momento do primeiro diagnóstico positivo entre testes diagnósticos, por grupo experimental

Não se observou diferença significativa entre o dia de primeiro diagnóstico positivo entre os testes em cada grupo separadamente, pois muitas amostras tiveram o primeiro positivo aos 15 dias para um teste e aos 30 dias para outro teste, períodos muito próximos que demonstrou não haver diferença. Somente no grupo 1, observou-se um valor próximo do limite de significância ($p = 0,059$).

4.5.2 Comparação do momento do primeiro diagnóstico positivo entre os grupos experimentais, por teste diagnóstico

Com relação ao teste de IDGA foi observada diferença estatística das médias dos momentos do primeiro diagnóstico positivo entre os grupos 1 e 2 ($p = 0,010$), sendo a média do grupo 2 maior que a do 1; e entre o grupo 1 e o controle positivo ($p = 0,036$), sendo a média do controle positivo maior que a do grupo 1.

O grupo experimental 2 e o grupo controle positivo demoraram mais para apresentar resultados positivos para IDGA comparando-se com o grupo 1.

Para os outros testes, os grupos apresentaram resultados positivos dentro do mesmo período de modo semelhante, não havendo diferença estatística.

4.5.3 Teste de concordância – valor de *kappa*

Os valores de *kappa* das fêmeas dos grupos experimentais 1 e 2 apresentam-se sumarizados na tabela 19.

Tabela 19 – Valores de *kappa* para cada momento analisado das fêmeas nos Grupos Experimentais 1 e 2 - São Paulo – 2011 a 2013

Grupo Experimental	Dias de gestação	IDGA-NESTED	IDGA-cELISA	cELISA-NESTED
1	15	+ 0.118 (p = 0.576)	n.c.	n.c.
	30	n.c.	- 0.200 (p = 0.624)	n.c.
	45	- 0.333 (p = 0.273)	- 0.200 (p = 0.624)	+ 0.333 (p = 0.273)
	60	+ 0.400 (p = 0.386)	- 0.500 (p = 0.386)	- 0.800 (p = 0.083)
	75	- 0.385 (p = 0.014) _a	- 0.200 (p = 0.624)	+ 0.077 (p = 0.624)
	90	+ 0.077 (p = 0.624)	- 0.200 (p = 0.624)	+ 0.077 (p = 0.624)
	105	+ 0.182 (p = 0.439)	n.c.	n.c.
	120	+ 0.182 (p = 0.439)	n.c.	n.c.
	135	n.c.	n.c.	- 0.385 (p = 0.014) _a
	150	n.c.	n.c.	- 0.385 (p = 0.014) _a
	15 dpp	n.c.	n.c.	- 0.333 (p = 0.273)
2	15	n.c.	n.c.	n.c.
	30	n.c.	n.c.	n.c.
	45	n.c.	n.c.	n.c.
	60	n.c.	+ 0.333 (p = 0.273)	n.c.
	75	n.c.	+ 0.333 (p = 0.273)	n.c.
	90	n.c.	+ 0.333 (p = 0.273)	n.c.
	105	n.c.	+ 0.182 (p = 0.439)	n.c.
	120	n.c.	+ 0.333 (p = 0.273)	n.c.
	135	n.c.	+ 0.667 (p = 0.083)	n.c.
	150	n.c.	+ 0.400 (p = 0.386)	n.c.
	15 dpp	n.c.	+ 0.286 (p = 0.361)	n.c.

15 dpp: 15 dias pós-parto

_a: valores concordantes (p < 0.05)

n.c.: não calculado

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Foram calculados os valores de *kappa* para o grupo de todas as fêmeas que foram inseminadas com o inóculo viral acompanhadas até 210 dias pós IA, na tabela 20.

Tabela 20 – Valores de kappa de todas as fêmeas inseminadas com o inóculo viral monitoradas até 210 dias pós-IA - São Paulo – 2012 a 2014

Dias pós-IA com CAEV	IDGA- NESTED	IDGA-cELISA	cELISA- NESTED
Antes IA	n.c.	n.c.	n.c.
15	n.c.	n.c.	n.c.
30	n.c.	n.c.	n.c.
45	n.c.	n.c.	n.c.
60	n.c.	+ 0.364 (p = 0.078)	n.c.
75	n.c.	+ 0.286 (p = 0.127)	n.c.
90	n.c.	+ 0.286 (p = 0.127)	n.c.
105	n.c.	+ 0.340 (p = 0.091)	n.c.
120	n.c.	+ 0.340 (p = 0.091)	n.c.
135	n.c.	+ 0.588 (p = 0.016) _a	n.c.
150	n.c.	+ 0.364 (p = 0.078)	n.c.
165	n.c.	+ 0.435 (p = 0.057)	n.c.
180	n.c.	+ 0.182 (p = 0.343)	n.c.
195	n.c.	+ 0.182 (p = 0.343)	n.c.
210	n.c.	+ 0.286 (p = 0.197)	n.c.

_a: valores concordantes (p < 0.05)

n.c.: não calculado

Fonte: (HASEGAWA, M.Y., 2014).

Não foi possível realizar a mesma análise de concordância para os filhotes, dado o número excessivo de valores negativos.

5 DISCUSSÃO

Não foram observadas alterações clínicas significativas ao exame clínico dos animais. Segundo Wilkerson et al. (1995), a infecção e/ou soropositividade não estão obrigatoriamente relacionadas com a presença de sinais clínicos, uma vez que apenas 35% dos animais infectados apresentam algum sinal clínico da doença. Knowles (1997) relata que, apesar da soroprevalência da CAE em um rebanho poder atingir 90%, a maioria dos animais infectados não desenvolve sintomatologia clínica. Haase (1986) e Cheevers et al. (1988) comprovaram que a maioria das lesões microscópicas da CAE são de origem imunopatológica. Como as lesões muitas vezes decorrem do acúmulo de depósito de complexos antígeno-anticorpo ao longo do tempo, a ausência de alterações clínicas no presente trabalho pode ter sido ocasionada pela demora de resposta humoral numa fase inicial de infecção nas fêmeas do grupo experimental 2 e até pela ausência dessa resposta humoral em animais com soroconversão tardia. O subtipo de SRLV utilizado no presente estudo (B1) é associado em infecções de caprinos com sintomatologia clínica. Cardinaux et al. (2013) observaram que paralelamente a eliminação de animais sintomáticos, houve uma marcada diminuição na soroprevalência de caprinos infectados com o genótipo B1 (CAEV-Cork) da classificação dos SRLVs, proporcionando uma evidência indireta que o genótipo B1 é virulento para caprinos.

De um total de 65 amostras analisadas provenientes das fêmeas do grupo experimental 2, 32 (49,23%) foram positivas para cELISA. Das quatro fêmeas positivas ao cELISA, dois (animais “O” e “Q”) apresentaram positividade a partir de 30 dias pós IA e mantiveram-se positivos até 15 dias de puerpério. A fêmea “T” mostrou positividade a partir de 45 dias de gestação e manteve resultado positivo até 15 dias de puerpério.

A cabra “P” não demonstrou positividade contínua como as fêmeas “O”, “Q” e “T”; somente apresentou resultados positivos para cELISA nos momentos 105 e 150 dias de gestação e 15 dias de puerpério. Talvez seja possível que as amostras da fêmea “P” referentes aos 120 e 135 dias de gestação que apresentaram resultado negativo são, na verdade, falso-negativas. Esse comportamento de um animal sabidamente positivo que apresenta resultados negativos pode ser explicado pela

presença de intermitência da resposta imunológica, com níveis de anticorpos variáveis, mensurado por testes de IDGA, ELISA e Western Blot observada em animais acompanhados ao longo de semanas, meses ou até anos (ROWE et al., 1992; RIMSTAD et al., 1993; PREZIUSO et al., 2003). Também é relatado que normalmente após a soroconversão, os níveis de anticorpo se elevam até um determinado pico e depois caem para um nível menor, porém estável (ADAMS et al., 1980; CHEEVERS et al., 1988).

Os resultados observados no presente estudo discordam daqueles encontrados por Adams et al. (1983) que nenhuma fêmea apresentou soroconversão após 18 meses de IA utilizando-se bodes infectados. Uma das causas para a diferença entre os tempos de soroconversão encontrados nos diferentes trabalhos pode ter sido a diferença de susceptibilidade dos animais, uma variável que não pode ser contornada. Outro fator que pode influenciar diferentes tempos de soroconversão é a diferença entre quantidades de carga viral viável presente nos bodes reprodutores naturalmente infectados do estudo de Adams et al. (1983) e presente artificialmente no sêmen no grupo experimental 2. O título estipulado para a infecção experimental pode representar valores muito além encontrados em situações naturais de infecção, podendo demonstrar uma infecção experimental com caráter mais consistente.

Das seis fêmeas do grupo experimental 2 que foram acompanhadas, somente duas cabras não soroconverteram; as cabras “H” e “N” não apresentaram Ac anti-CAEV em IDGA e cELISA. Pode-se sugerir que o inóculo viral utilizado para a inseminação artificial não estava viável mesmo tendo o cuidado em armazená-los em freezer -70°C.

Ainda com relação às duas fêmeas que não soroconverteram, a cabra “H” foi inseminada no mesmo momento que a cabra “U” e esta última apresentou soroconversão, indicando que o inóculo estava viável. Já a fêmea “N” fora a única inseminada na data.

Peterson et al. (2008) relatam que podem ocorrer casos de animais, que mantiveram contato com o lentivírus caprino, apresentarem resultados negativos para sangue em PCR; podendo ser sugerido que esses animais foram infectados

porém, a replicação viral fora fortemente restringida por fatores do hospedeiro. Cardinaux et al. (2013) também relatam fatores como componentes genéticos do hospedeiro que podem controlar a carga viral desses lentivirus, influenciando potencialmente a eficiência da resposta imune.

Ainda a respeito das fêmeas “H” e “N” que não apresentaram Ac anti-CAEV durante período de monitoramento, pode representar um cenário de soroconversão tardia dessas fêmeas, e por isso o teste sorológico não foi capaz de detectar positividade. Foi relatado por Rimstad et al. (1993) que os testes sorológicos usados rotineiramente no diagnóstico da doença podem aparentemente subestimar o número de animais infectados justamente devido a soroconversão tardia e a insensibilidade do teste.

A prova de IDGA reconhece anticorpos contra a proteína p28 presente no capsídeo e o kit utilizado possui sensibilidade de 66,67% e especificidade de 90,48% (SILVA et al., 2013). Este fato, aliado ao baixo custo e a alta praticidade, proporciona uma grande importância principalmente em levantamentos epidemiológicos e na triagem de animais.

Juntamente com a técnica de IDGA, o teste ELISA é uma das técnicas recomendadas pela OIE (2004) e vale ressaltar que para o diagnóstico das infecções retrovirais não há testes “padrão ouro” (BARQUERO et al., 2013). Herrmann et al. (2003) obtiveram uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,4% no teste cELISA, o mesmo utilizado no presente estudo, que é baseado no emprego do anticorpo monoclonal que se liga a glicoproteína 135 presente na superfície do envelope do lentivirus.

Esse comportamento de um animal sabidamente positivo que apresenta resultados negativos pode ser explicado pela presença de intermitência da resposta imunológica, com níveis de anticorpos variáveis, mensurado por testes de IDGA, ELISA e Western Blot observada em animais acompanhados ao longo de semanas, meses ou até anos (ROWE et al., 1992; RIMSTAD et al., 1993; PREZIUSO et al., 2003). Também é relatado que normalmente após a soroconversão, os níveis de anticorpo se elevam até um determinado pico e depois caem para um nível menor,

porém estável (ADAMS; CRAWFORD; KLEVJER-ANDERSON, 1980; CHEEVERS et al., 1988).

As provas de imunodiagnóstico dependem do aparecimento de anticorpos, que é variável, dependendo do nível de replicação viral em cada animal (TIGRE; CAMPOS; SARDI, 2006), observando-se menor tempo médio de soroconversão em rebanhos com maior prevalência (PETERHANS et al., 2004). Com base nesta afirmação, o estudo foi conduzido em ambiente controlado, ou seja, crias separadas imediatamente após nascimento e mantidas em baias isoladas sem o contato com animais externos, como num rebanho com prevalência baixa, e obtiveram resultados negativos na sorologia por cELISA, podendo possivelmente significar um maior tempo necessário para o aparecimento de soroconversão.

Tanto as fêmeas do grupo experimental 2 como do grupo controle 2 não apresentaram resultados positivos ao nested-PCR. A negatividade dos resultados para nested-PCR não pode ser interpretada como falso-negativo, pois autores observaram intermitência do DNA pró-viral presentes em sêmen e sangue (ANDRIOLI et al., 2006; PETERSON et al., 2008; MINARDI et al., 2009).

Ainda, Peterson et al. (2008) relatam que podem ocorrer casos de animais, que mantiveram contato com o lentivírus caprino, apresentarem resultados negativos para sangue em PCR; podendo ser sugerido que esses animais foram infectados porém a replicação viral fora fortemente restringida por fatores do hospedeiro.

Outra possibilidade gira em torno do fato do CAEV não infectar leucócitos, mas sim monócitos, os quais constituem apenas 10% dos leucócitos do sangue periférico e somente nessas células seria detectado o pró-vírus (RUTKOSKI et al., 2001), implicando na falha de detecção do DNA pró-viral simplesmente por causa da carga viral estar abaixo do limite de detecção da técnica (SMITH; SHERMAN, 1994; ANDRÉS et al., 2005).

Rimstad et al. (1993), pesquisando a presença do lentivírus em amostras de sangue e leite por PCR, encontraram em 17/72 amostras de leite e 24/72 amostras de sangue positivas, usando iniciadores da região gag. Em geral, a baixa positividade encontrada indica 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. Entretanto no presente estudo, a técnica de nested-PCR falhou em detectar a infecção antes da soroconversão das fêmeas do grupo experimental 2.

São relatadas outras desvantagens da técnica devido a baixa percentagem de positivos para nested-PCR (GONZALES et al., 2013), a baixa sensibilidade (ANDRÉS et al., 2005), a ocorrência de falsos positivos nesta técnica (BRINKHOF et al., 2008; BRINKHOF et al., 2010; BARQUERO et al., 2011).

Andrés et al. (2005) relataram que a variação das amostras de campo e a baixa carga viral *in vivo* também contribuem para os principais obstáculos encontrados na padronização das provas de PCR para o diagnóstico da CAE.

Muitos são os trabalhos que concordam com os resultados do presente trabalho.

Santos et al. (2009) relatam a baixa co-positividade na detecção de CAEV entre nested-PCR e IDGA. Apenas uma amostra obteve co-positividade ao IDGA e nested-PCR. A baixa co-positividade entre nested-PCR e IDGA também foi observada no presente estudo. As fêmeas do grupo experimental 1 e as crias do grupo experimental 2 obtiveram respectivamente, 14/54 (25,93%) e 4/15 (26,67%). Os resultados dos demais animais não apresentaram co-positividade entre IDGA e nested-PCR. Com relação a co-positividade entre cELISA e nested-PCR, somente as fêmeas do grupo 1 apresentaram co-positividade em 13/55 (23,63%).

Gonzales et al. (2013) estudaram a concordância entre os testes cELISA e nested-PCR na detecção do vírus da CAE em propriedades com histórico da presença da CAE baseados em investigação anterior da doença. O kit de cELISA foi o mesmo utilizado no presente estudo e os primers utilizados na técnica de nested-PCR amplificaram regiões do gene *gag*. Os resultados apresentados por Gonzales et al. (2013) concordam com os do presente estudo. Com relação à co-positividade entre cELISA e nested-PCR, obtiveram 5/24 (20,83%). De um total de 262 amostras analisadas, somente 15 (5,73%) apresentaram resultado positivo para cELISA e 9 (3,44%) para nested-PCR. Quatro das 247 cabras soronegativas (1,62%) foram positivas ao nested-PCR e 10 cabras de 253 nested-PCR negativas, foram positivas

ao cELISA (3,95%). O valor de kappa encontrado por Gonzales et al. (2013) foi de 0.39, indicando concordância razoável entre os dois testes.

Barquero et al. (2013) também observaram baixa concordância entre as técnicas de PCR e ELISA com valores de kappa para caprinos 0.124 e 0.114, indicando concordância muito baixa entre os dois testes. Uma das hipóteses apresentadas por Barquero et al. (2013) é a de que os primers não anelariam corretamente com o DNA extraído. Outra hipótese apresentada seria a alta taxa de mutação desses vírus, calculado como 1 mutação para cada 10^5 nucleotídeos (ANDRÉS et al., 2005) que diminuiria a eficácia da técnica de PCR para a detecção do DNA pró-viral.

A técnica de PCR não pode ser utilizada como única técnica diagnóstica para SRLV em caprinos. E, quando o teste cELISA também é utilizado como única opção de ferramenta diagnóstica, novos casos de infecção podem ser perdidos.

Rutkoski et al. (2001) ao compararem resultados de IDGA com PCR, observaram que se considerando o total de amostras avaliadas, o teste de IDGA detectou maior número de animais infectados pelo CAEV (25/80), quando comparado com a PCR (16/80). Este trabalho concorda com os resultados do presente estudo, com maiores porcentagens para IDGA do que para nested-PCR nas fêmeas dos grupos experimentais 1 e 2 e do grupo controle 2, também apresentou baixos índices de amostras positivas em PCR, com resultados discordantes entre IDGA e PCR e o teste de PCR foi capaz de detectar animais soronegativos como nas crias dos grupos experimentais 1 e 2.

Cardinaux et al. (2013) analisaram diferentes tipos de testes ELISA que detectam específicos subtipos de SRLV, diferentes tipos de PCR (qPCR, RT-PCR) utilizando diferentes materiais para extração (leite, células mononucleares de sangue periférico). O kit cELISA, utilizado tanto no estudo citado quanto no presente estudo, apresentou ótima eficiência em detectar caprinos infectados com o subtipo B1 em comparação ao subtipo A4. Coincidentemente o mesmo subtipo B1 foi utilizado no inóculo viral do presente estudo, e o teste cELISA apresentou também maiores porcentagens de amostras positivas obtidas para as fêmeas dos grupos experimentais 1 e 2 e grupo controle 2. No trabalho citado, houve dificuldade em se

detectar sorologicamente animais positivos ao qPCR e também em se isolar e posterior detecção do vírus em uma cabra fortemente soropositiva, assim como no presente estudo. Segundo Cardinaux et al. (2013) esses resultados podem refletir diferentes valores de sensibilidade e especificidade num mesmo teste, calculados baseados no status virológico de animais que se revestem de uma dramática dicotomia entre latência sorológica e virológica.

Com relação ao inóculo viral utilizado no presente estudo, foi detectada pela técnica de cELISA a presença de anticorpos anti-CAEV em fêmeas do grupo experimental 2 após 30 dias pós IA, comprovando a transmissão via sêmen, corroborando com Souza et al. (2013) que também demonstraram a transmissão do lentivirus caprino por IA para fêmeas não reagentes utilizando-se inóculos virais com cargas virais infectantes determinados em 10^6 TCID₅₀/mL e 10^2 TCID₅₀/mL para adição direta em sêmen. As fêmeas do estudo supracitado também apresentaram resultados positivos a partir de 30 dias pós IA, entretanto para os testes de IDGA e Western Blot.

O título infectante utilizado no presente estudo (10^5 TCID₅₀/mL) foi capaz de proporcionar a infecção para as fêmeas. A carga viral utilizada compreende dentro dos títulos utilizados em estudos anteriores por Adams, Crawford e Klevjer-Anderson (1980); East et al. (1993); Guedes, Souza e Gouveia (2001); Ali Al Ahmad et al. (2012); Fieni et al. (2012) e Souza et al. (2013) que comprovaram ser eficientes em se demonstrar a transmissão por diferentes vias. Fieni et al. (2012) utilizou mesmo título infectante utilizado no presente estudo (10^5 TCID₅₀/mL) adicionado em sêmen congelado para realizar fertilização in vitro em oócitos livre de CAEV. Somente após a quarta lavagem, obtiveram todos os cinco embriões livres de CAEV segundo resultados por nested-PCR e RT-PCR. Ali Al Ahmad et al. (2012) inocularam em ejaculados de bodes livres de CAEV uma dose infectante de CAEV com concentração em 10^4 TCID₅₀/mL para inseminação intrauterina por controle endoscópio. Oito de 14 esfregaços uterinos e nove de 14 meios de lavagem obtidos durante colheita de embriões apresentaram DNA pró-viral, embora todos os 49 embriões colhidos tiveram resultados negativos pela PCR. Guedes, Souza e Gouveia (2001) inocularam cabritos livres de CAEV de uma semana de vida com título infectante de 10^6 TCID₅₀/mL por via intravenosa e via intranasal. Apenas um cabrito com inoculação via intranasal apresentou uma imunomarcagem em

citoplasma de macrófago alveolar de pulmão por imuno-histoquímica. East et al. (1993), utilizando título de $10^{6,3}$ TCID₅₀/mL, observaram a soroconversão pós-inoculação intravenosa em quatro semanas. E Adams, Crawford e Klevjer-Anderson (1980), ao utilizar título de $10^{6,2}$ TCID₅₀/mL, inocularam o lentivirus caprino por via intravenosa e conseguiram detectar anticorpos aos 21 dias pós-infecção por IDGA.

A escolha de fêmeas recém-infectadas para compor o grupo controle 2 influenciou os resultados, pois não houve sequer uma amostra positiva ao nested-PCR e somente 61,90% no IDGA. Ao contrário das fêmeas do grupo 1, que apresentaram 87,10% de resultado positivo para IDGA e 25,81% para nested-PCR. As fêmeas do grupo 1 são infectadas há pelo menos três anos; com status de infecção bem estabelecidos e com resultados positivos para IDGA durante período anterior ao experimento.

Com relação aos testes utilizados, o cELISA apresentou maiores resultados positivos e foi capaz de detectar a soroconversão mais cedo que o IDGA. Se observarmos nos dois grupos experimentais, todas as fêmeas tiveram maior positividade em cELISA, o IDGA não conseguiu detectar em tantos momentos como o cELISA, que é uma técnica mais sensível.

Nas 11 fêmeas inseminadas com CAEV, o teste de IDGA conseguiu detectar somente 24,05% de amostras positivas contra 56,96% referentes ao teste cELISA. O teste de IDGA, por apresentar sensibilidade menor que o teste cELISA, obteve desempenho inferior por não conseguir detectar Ac anti-CAEV durante fase inicial da infecção. Segundo Saman et al. (1999), 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.

O baixo número de animais positivos pelo IDGA pode ser explicado ainda pelo fato de que os animais em questão certamente estão numa fase inicial da infecção. Nesta fase, a produção de anticorpos é inexistente ou baixa, não sendo detectado pela imunodifusão (ADAMS et al., 1983). O IDGA necessita de uma quantidade de anticorpos relativamente alta (30 ug/cm^3) para ser identificado (TIZARD, 1998). Wagter et al. (1998) afirmam que a produção de anticorpos a níveis

detectáveis pelo IDGA é demorada, podendo ocorrer até 18 meses após a detecção pelo PCR ou até mesmo não acontecer.

Ao analisar o período monitorado durante as gestações de todas as fêmeas soropositivas ao CAEV, não é observada uma queda nos níveis de Ac detectáveis pelas provas de IDGA e cELISA, não havendo sugestão na ocorrência da diminuição na resposta imune contra o lentivirus caprino. Mesmo que as fêmeas do grupo experimental 2 (influência do sêmen) apresentaram resultados negativos para IDGA em grande parte da gestação, não se deve considerar como imunossupressão, pois a negatividade sorológica é explicada pela fase inicial de infecção do lentivirus. As fêmeas do grupo experimental 1 (influência da placenta) apresentavam status de infecção já estabelecidos e obtiveram resultados positivos para IDGA e cELISA durante a gestação, também não indicando diminuição nos níveis de Ac detectáveis.

Não foi calculada a porcentagem de sensibilidade, especificidade, falso-positivo e falso-negativo, embora muitos estudos referem valores de sensibilidade e especificidade na comparação entre testes sorológicos e técnicas de PCR na detecção de SRLV, tais comparações avaliam concordância e não sensibilidade e especificidade, pois esses dois tipos de provas detectam diferentes elementos no sangue (HERRMANN-HOESING, 2010).

A positividade encontrada em nested-PCR em crias do grupo 2 pode ter um significado particular de identificar animais infectados porém soronegativos, como em situações de animais com soroconversão tardia, quando a produção de anticorpos é baixa ou mesmo inexistente ou em casos de fase inicial de infecção, quando a técnica apresenta maior sensibilidade (FROTA; SILVA; ARAÚJO, 2005; TIGRE; CAMPOS; SARDI, 2006; SOUZA, 2010).

Ainda considerando-se a variação nos resultados obtidos com a utilização de diferentes métodos de diagnóstico do vírus da CAE, resultado semelhante foi encontrado por Frota, Silva e Araújo (2005), que trabalhando com cabritos filhos ou netos de animais soropositivos para o CAEV, identificaram que 35 (76,08%) cabritos no primeiro ano de vida, possuíam o DNA pró-viral em células mononucleares do sangue periférico, porém somente um animal (2,17%) teve resultado positivo ao

teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), teste recomendado pela OIE (2004).

A progênie do grupo experimental 2 apresentou 15 (11,28%) amostras positivas na nested-PCR, sete (5,26%) amostras positivas no IDGA e nenhuma ao cELISA. O valor da porcentagem para nested-PCR é maior que o dobro da porcentagem no IDGA, indicando que a técnica de nested-PCR conseguiu detectar mais amostras positivas que o IDGA. Comparando-se os resultados entre si, observa-se que os cabritos 18 e 19 apresentaram positividade ao nested-PCR mais precocemente, aos dois e três meses respectivamente, quando comparado ao IDGA com resultados aos três e quatro meses respectivamente.

Os cabritos 04, 05, 06, 07, 16 e 17 do grupo experimental 1 e os cabritos 20, 21, 22, 23 e 24 do grupo experimental 2 apresentaram resultados positivos ao nested-PCR e nenhum positivo aos dois testes sorológicos. Barquero et al. (2011) relataram que embora alguns animais com resultados positivos para PCR, porém negativos para ELISA podem ser erroneamente denominados falso-positivos, pois estudos posteriores mostraram que esses animais eventualmente soroconverteram e, conseqüentemente foram considerados como verdadeiros positivos.

Brinkhof et al. (2008) obtiveram a mesma dúvida, com relação aos animais soronegativos e positivos ao PCR, a qual foi elucidada após confirmação de análise baseada no sequenciamento genético.

Para saber de que se trata de um resultado falso positivo, seria altamente desejável realizar o sequenciamento das amostras positivas das crias, com a análise filogenética a fim de precisar sua homologia com o lentivirus caprino.

Alternativamente poder-se-ia realizar o estudo de controle endógeno da amostra através da pesquisa do gene constitutivo (12S) para caprino (housekeeping) (SILVA et al., 2013) ou como controle interno da reação, para a avaliação da integridade do DNA das amostras, a amplificação do quarto exon do gene da β -actina humana (ALI AL AHMAD et al., 2008b; MINARDI, 2009).

Silva et al. (2013) utilizou a técnica de qPCR em amostras de sangue e leite apresentando boa performance, com sensibilidade de 100%, especificidade de 92,86%, concordância de 93,75% para o teste de IDGA e indicador kappa de 0,765.

Utilizando-se outra técnica diagnóstica, sugerido por Rutkoski et al. (2001) o Southern Blot aumentaria a sensibilidade de detecção dos produtos de PCR que não tivessem sido visualizados em gel corado com brometo de etídio.

Portanto, não é possível assumir a transmissão do lentivírus caprino para crias de forma inofismável, entretanto não descartamos a possibilidade de infecção das crias com soroconversão tardia.

Para a progênie do grupo experimental 1, não foram observados em nenhum momento analisado qualquer resultado positivo para a prova de IDGA. Para as crias do grupo controle 2, apenas uma amostra resultou positiva para o teste.

Para as crias do grupo experimental 2, foi observada a presença de Ac anti-CAEV em IDGA nos cabritos 18 e 19, filhos da cabra “O”, aos três e quatro meses de vida, respectivamente, e nos cabritos 27 e 28, filhos da cabra “N”, aos 15 e 30 dias de vida e aos 15, 30 e 90 dias de vida respectivamente. A fêmea “O” apresentou soroconversão a partir de 30 dias pós-infecção para cELISA e 60 dias para IDGA. Surpreendentemente, a fêmea “N” não apresentou nenhum resultado positivo durante período analisado pelas três técnicas diagnósticas utilizadas, sinalizando uma possível transmissão dos cabritos diretamente pelo sêmen infectado.

Uma provável explicação para o baixíssimo número de amostras positivas da prole dos grupos experimentais 1, 2 e grupo controle 2, poderia ser a tolerância ao vírus. Neste caso o animal se infecta ainda nos primeiros meses da gestação, não sendo capaz de identificar o vírus como uma partícula não própria (non-self), pois somente durante o terço final da gestação, o completo desenvolvimento do sistema imune fetal é concluído (MOENNIG; LIESS, 1995). Desta forma, ao nascimento, o cabrito não produz anticorpos contra o agente, como ocorre em infecções causadas pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV), quando a infecção se sucede no primeiro trimestre da prenhez (LANYON et al., 2014). Frota et al. (2005) também verificaram certa semelhança com esta situação. Embora este fato nunca tenha sido relatado

para o CAEV, não pode ser descartado, sendo necessário um estudo mais aprofundado para sua confirmação (FROTA et al., 2005).

Estudos sobre a transmissão natural via colostro relatam que a imunidade ativa começa após por pouco mais de dois meses de vida (ÁLVAREZ et al., 2005; ÁLVAREZ et al., 2006) ou a partir dos 84 dias de idade ou mais tarde, (ELLIS et al., 1986) após o declínio inicial da imunidade passiva adquirida pelo colostro. No presente estudo foi excluída a interferência dos anticorpos colostrais (ÁLVAREZ et al., 2005; ÁLVAREZ et al., 2006) fornecendo aos cabritos colostro aquecido de vaca, e ainda assim não foi observada uma soroconversão evidente. Os anticorpos anti-CAEV das crias referentes ao grupo experimental 2 e grupo controle 2 foram detectados entre 15 dias de vida até aos quatro meses. Em experimentos realizados com animais infectados pelas vias oral, intravenosa ou intrarticular com o CAEV, foi observada soroconversão detectada pelo IDGA entre 3 e 12 semanas pós-infecção (ADAMS; CRAWFORD; KLEVJER-ANDERSON, 1980; ELLIS et al., 1986; EAST et al., 1993), o que pode indicar diferença quanto ao tempo para ocorrência de soroconversão entre a infecção natural (via colostro) e a infecção experimental.

Quanto as crias dos grupos experimentais 1 e 2 e grupo controle 2, não houve resultado positivo para a prova de cELISA em nenhum momento analisado, não sendo observada a soroconversão das mesmas. Entretanto não se pode afirmar que não houve transmissão vertical, pois é relatada a existência de animais infectados com soroconversão tardia (RIMSTAD et al., 1993). Concomitantemente as crias dos dois grupos experimentais apresentaram positividade na técnica de nested-PCR. Barquero et al. (2013) relataram que quando a prova de ELISA é utilizada como única técnica diagnóstica, novos casos de infecção podem não ser detectados. Para contornar tal dificuldade na detecção de novos infectados, é recomendado o uso concomitante de uma técnica diagnóstica indireta e direta.

A presença de células infectadas pelo lentivirus, seja originária do epitélio ou de macrófagos, encontrada em secreções pós-parto em caprinos (ROWE, 1999) pode contribuir para a infecção da prole ao nascimento, mensurada em 18% por Cross, Smith e Moorhead (1975) e em 11% por Brodie et al. (1994). De acordo com Ali Al Ahmad, Fieni e Martignat (2005) embora a placentação cotilédone-epiteliocorial de pequenos ruminantes normalmente previne contato direto entre

sangues materno e fetal, o intercâmbio celular pode ocorrer se houver uma inflamação local com infiltração leucocitária. A presença desses leucócitos favoreceria a infecção do neonato durante nascimento, durante maturação placentária, distensão da cérvix (ALI, 1987; OWINY et al., 1995) e/ou durante cesárea (HOFF-JÖRGENSEN, 1977).

Entretanto, não houve influência no potencial de transmissibilidade do lentivirus caprino quanto ao procedimento (cesárea, episiotomia, assistência ao parto distócico) realizado durante a parição. A cabrita 14 nasceu de parto distócico em que foi necessário realizar episiotomia no momento do parto, também não apresentou qualquer resultado positivo. A cabrita 30 do grupo controle 2 que também nasceu de parto distócico e manteve contato com sangue materno, não apresentou qualquer resultado positivo. Esse comportamento observado no presente estudo discorda de estudos anteriores que afirmam soroconversão da progênie por cesárea ou parto natural sem o consumo de colostro materno (ADAMS et al., 1983) e com o aleitamento com leite pasteurizado ou substitutos do leite (ROWE; EAST, 1997).

Também estudando a transmissibilidade do vírus da CAE por transmissão vertical Lara, Birgel Júnior e Birgel (2005) relataram que, apesar dos riscos, a probabilidade de infecção do vírus da CAE por transmissão vertical (transplacentária ou durante o parto) foi menor que 1/26, o que é menor do que 3,8% e, estão de acordo com Narayan e Cork (1990), os quais consideram que a infecção transplacentária do feto por meio do sangue verídico da mãe não parece ser a mais importante rota de disseminação da doença.

A cabrita 29 nasceu por procedimento de cesárea e teoricamente esteve mais exposta ao sangue materno, porém não apresentou qualquer resultado positivo, entretanto a progenitora da cabrita 29, inseminada com o inóculo viral, também não apresentou qualquer resultado positivo nas três provas diagnósticas.

Em ambos os grupos experimentais 1 e 2, as crias apresentaram maiores taxas de positividade para nested-PCR aos três meses. Pode-se sugerir que houve influência do stress provocado pelo desmame realizado a partir dos dois meses de idade, contribuindo para a interferência nos resultados obtidos.

Segundo Franke (1998), a produção de anticorpos e sua concentração no sangue de um animal infectado são influenciadas por situações de estresse, pela presença de outras doenças, condição alimentar e idade. Peterson et al. (2008) relataram que o estresse durante estação de monta é conhecido por ativar cargas virais do lentivirus caprino e sua subsequente excreção e detecção de DNA pró-viral em ejaculados de bode infectados, comprovado por Paula et al. (2009) que observaram maior presença viral em sangue e sêmen durante período de transição da estação chuvosa para seca, possivelmente proporcionando algum grau de estresse aos bodes.

Não existem vacinas disponíveis nem terapêutica eficaz. Por isso, como objetivo primordial, a forma de combater a enfermidade é detectando-se o vírus precocemente nos rebanhos (REINA et al., 2009), devendo-se atentar para fatores como soroconversão tardia, latência viral e latência sorológica (PINHEIRO et al., 2010).

E, por último, espera-se que os resultados do presente estudo possam ser aplicados no auxílio de definir e propor tomadas de decisão prioritárias para programas de controle do vírus da CAE e medidas de erradicação a serem implementadas, em última análise, oferecendo um considerável aprimoramento na manutenção da sanidade caprina e assim, melhorar a produtividade, o bem-estar e a rentabilidade da cadeia produtiva.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- a) foi possível observar a transmissão do CAEV para fêmeas livres de CAEV por sêmen com inóculo viral.
- b) o sêmen é uma via de transmissão para fêmeas por IA.
- c) o título infectante do inóculo viral utilizado foi capaz de infectar fêmeas livres de CAEV.
- d) a associação de diferentes testes, como cELISA e nested-PCR, pode melhorar o desempenho do diagnóstico, devendo-se atentar para fatores como soroconversão tardia, latência viral e latência sorológica de animais infectados.
- e) não foi possível assumir a transmissão do lentivírus caprino para crias de forma insofismável, pois não foi realizado um estudo de análise filogenética para as amostras positivas ao nested-PCR, entretanto não é descartada a possibilidade de infecção das crias por vias placentária e sêmen com soroconversão tardia.

REFERÊNCIAS

- ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o vírus do Maedi-visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n.2, p. 57-60, 1998.
- ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B.; KLEVJER-ANDERSON, P. A pathogenic study of early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. **American Journal of Pathology**, v. 99, n. 2, p. 257-271, 1980.
- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, B. S.; MCGUIRE, T. C. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, p. 1670-1675, 1983.
- ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Records**, v. 115, p. 493-495, 1984.
- ALI, A. O. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. **Veterinary Records**, v. 121, p. 131-132, 1987.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L. 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.1656-1666, 2005.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; GUIGEN, F.; LARRAT, M.; PELLERIN, J. L.; ROUX, C. Cultured goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. **Virology**, v. 353, p. 307–315, 2006.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; CHEBLOUNE, Y.; BOUZAR, B. A.; BARIL, G.; BOUVIER, F.; CHATAGNON, G. Lack of risk of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) during embryo transfert. **Theriogenology**, v. 69, p. 408–15, 2008a.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J. L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G. Detection of viral genomes of caprine arthritis- encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, p. 473–80, 2008b.

ALI AL AHMAD, M. Z.; CHEBLOUNE, Y.; CHATAGNON, G.; PELLERIN, J. L.; FIENI, F. Is caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) transmitted vertically to early embryo development stages (morulae or blastocyst) via in vitro infected frozen semen? **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1673-8, 2012.

ALMEIDA, M. G. A. R.; ANUNCIAÇÃO, A. V. M.; FIGUEREDO, A.; MARTINEZ, T. C. N.; LABORDA, S. S. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da Artrite - Encefalite Caprina (CAE) no estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n. 3, p. 78-83, 2001.

ÁLVAREZ, V.; ARRANZ, J.; DALTABUIT-TEST, M.; LEGINAGOIKOA, I.; JUSTE, R. A.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D.; LUJÁN, L. L.; BADIOLA, J. J.; BERRIATUA, E. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 78, n. 3, p. 237–243, 2005.

ÁLVAREZ, V.; DALTABUIT-TEST, M.; ARRANZ, J.; LEGINAGOIKOA, I.; JUSTE, R. A.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D.; LUJÁN, L. L.; BADIOLA, J. J.; BERRIATUA, E. PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 226–234, 2006.

ALVES, F. S. S.; PINHEIRO, R. R. Presença da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997. Gramado-RS. **Anais...** Gramado: [s. n.], 1997. p. MVP 008.

ALVES, F. S. F. **Fatores de risco e transmissão da artrite encefalite caprina a vírus**. Sobral: Embrapa Caprinos, 1999. 15 p. (Embrapa Caprinos. Documentos 29).

ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N. J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.; HARKISS, G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 49–62, 2005.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA, SOBRINHO, P. A.; PINHEIRO, R. R.; SALLES, H. O. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 5, p.215-220, 2002.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; YORINORI, E. H.; SILVA, M. X. Possível transmissão materno-fetal do vírus da artrite encefalite caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2004, São Luís. **Anais...**. São Luís: [s.n], 2004.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p. 1313-1319, 2006.

ARCHAMBAULT, D.; EAST, N.; PERK, K.; DAHLBERG, J. E. Development of an enzyme-linked Immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 971-975, 1988.

ASSIS, A. P. V.; GOUVEIA, A. M. G. Evidência sorológica de lentivírus (Maedi Visna/Cae) em rebanhos caprinos nos estados de MG, RJ, BA e CE. In: ENCONTRO DE PESQUISA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG, 14., 1994, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1994. p. 46-46.

BANDEIRA, D. A. B.; DE CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; MELO, L. S. S.; MELO, C. B. Seroprevalence of Caprine Arthritis–Encephalitis Virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 399-401, 2009.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D.; VAN HOOSEAR, K.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E.; VAN HOOSEAR, K. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **Journal of Virological Methods**, v. 50, p. 101-114, 1994.

BARQUERO, N.; ARJONA, A.; DOMENECH, A.; TOURAL, C.; DE LAS HERAS, A.; FERNANDEZ- GARAYZABAL, J. F.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; GOMEZLUCIA, E. Diagnostic performance of PCR and ELISA on blood and milk samples and serological survey for small ruminant lentiviruses in central Spain. **Veterinary Record**, v. 168, n. 1, p. 20, 2011.

BARQUERO, N.; DOMENECH, A.; ARJONA, A.; FERNÁNDEZ-GARAYZABAL, J. F.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.; GOMEZ-LUCIA, E. Comparison of two PCR and one ELISA techniques for the detection of small ruminant lentiviruses (SRLVs) in milk of sheep and goats. **Research in Veterinary Science**, v. 94, p. 817–819, 2013.

BATISTA, M. C. S.; DE CASTRO, R. S.; CARVALHO, F. A. A.; CRUZ, M. S. P.; SILVA, S. M. M. S.; REGO, E. W.; LOPES, J. B. Anticorpos anti-lentivírus de

pequenos ruminantes em caprinos integrantes de nove municípios Piauienses. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 7, n. 2/3, p. 75-81, 2004.

BÉLANGER, D.; LÉBOEUF, A. CAE virus seroprevalence in a mixed goat herd. **Veterinary Records**, v. 133, p. 323, 1993.

BERTONI, G.; ZAHNO, M. L.; ZONONI, R.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E.; RUFF, G.; CHEEVERS, W. P.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp 38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. **Journal of Virology**, v. 68, p. 7139-7147, 1994.

BEZERRA JR., R. Q. **Influência da artrite encefalite caprina (CAE) nas características físico-químicas e microbiológica do leite e análise histológica da glândula mamária**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2011.

BIRGEL, E. H. Artrite-encefalite dos caprinos. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 6., 2000, São Paulo. [**Anais...**]. São Paulo: [s.n], 2000. 38 p. Apostila

BIRGEL JUNIOR, E. H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R. M.; BIRGEL, D. B.; RAIMONDO, R. F.; BRANDESPIN, F. B.; BIRGEL, E. H. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5., 2005, Búzios – RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Editora, 2005.

BLACKLAWS B. A.; BERRIATUA E.; TORSTEINSDOTTIR S.; WATT N. J.; DE ANDRES D.; KLEIN D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 199-208, 2004.

BLOOD, D. C.; RADOSTITIS, O. M. **Clínica veterinária**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1991. p. 783-784.

BOHLAND, E. **Artrite encefalite caprina: avaliação dos aspectos produtivos e reprodutivos de animais infectados e não infectados**. 1998. 95 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BRINKHOF, J. M.; VAN MAANEN, C.; WIGGER, R.; PETERSON, K.; HOUWERS, D. J. Specific detection of small ruminant lentiviral nucleic acid sequences located in the

proviral long terminal repeat and leader-gag regions using real-time polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 147, p. 338–344, 2008.

BRINKHOF, J. M. A.; HOUWERS, D. J.; MOLL, L.; DERCKSEN, D.; VAN MAANEN, C. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. **Veterinary Microbiology**, v. 142, p. 193–198, 2010.

BRODIE, S. J.; PEARSON, L. D.; SNOWDER, G. D.; DeMARTINI, J. C. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. **Archives of Virology**, v. 130, p. 413-428, 1992.

BRODIE, S. J.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; KÖENIG, G.; SNOWDER, G. D.; DeMARTINI, J. C. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 169, p. 653–7, 1994.

BRODIE, S. J.; PEARSON, L.; ZINK, M.; BICKLE, H.; ANDERSON, B.; MARCOM, K.; DEMARTINI, J. Ovine lentivirus expression and disease. Virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal of Pathology**, v. 146, p. 250-263, 1995.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001.

CAMINHA, C. M. M.; TEIXEIRA, M. F. S.; FEITOSA, A. L. V. L.; MELO, V. S. P.; MARTINS, G. R.; DANTAS, T. V. M.; PINHEIRO, R. R. Levantamento sorológico do vírus da artrite encefalite caprina e do vírus Maedi Visna na região norte e nordeste do Ceará. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UECE, 13.; V FEIRA DE CIÊNCIA, CULTURA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO DO ESTADO DO CEARÁ, 5., 2008, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2008.

CARDINAUX, L.; ZAHNOA, M. L.; DEUBELBEISS, M.; ZANONI, R.; VOGT, H. R.; BERTONI, G. Virological and phylogenetic characterization of attenuated small ruminant lentivirus isolates eluding efficient serological detection. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 572–581, 2013.

CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A.; ABREU, S. R. O. Evidência sorológica de infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina em caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 571-572, 1994.

CASTRO, R. S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. 1998, 128 f. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Belo Horizonte, 1998.

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

CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; TABOSA, I.; NASCIMENTO, S. A.; OLIVEIRA, M. M. M. Anticorpos para o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina em animais sem raça definida (SRD) de abatedouros dos estados de Pernambuco e Paraíba. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 5, n. 2-3, p.121-123, 2002.

CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2037-2051, 1996.

CHEEVERS, W. P.; ROBERSON, S. M.; KLEVJER-ANDERSON, P. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus; a retrovirus of goats. **Archives of Virology**, v. 67, p. 111-117, 1981.

CHEEVERS, W. P.; KNOWLES, D. P.; MCGUIRE, T. C.; CUNNINGHAM, D. R.; ADAMS, D. S.; GORHAM, J. R. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. **Laboratory Investigation**, v. 58, p. 510-517, 1988.

CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T.; NORTON, L. K. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression in vivo. **Virology**, v. 196, p. 835-839, 1993.

CHIU, I.; YANIV, A.; DAHLBERG, J. E.; GAZIT, A.; SKUNTZ, S.; TRONICK, S. R.; AARONSON, S. A. Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. **Nature**, v. 317, p. 366-368, 1985.

CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Bacterial expression of caprine arthritisencephalitisvirus gag and env proteins and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**, Philadelphia, v. 56, p. 841-848, 1995.

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

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

CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **Journal of Infectious Diseases**, v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974.

CORK, L. C. Differential diagnosis of viral leukoencephalomyelitis of goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 19, n. 12, p. 1303-1306, 1976.

CORTEZ-ROMERO, C.; FIENI, F.; ROUX, C.; RUSSO, P.; GUIBERT, J. M.; GUIGUEN, F. Detection of ovine lentivirus in the cumulus cells, but not in the oocytes or follicular fluid, of naturally infected sheep. **Theriogenology**, v. 66, p. 1131–1139, 2006.

CORTEZ-ROMERO, C.; PELLERIN, J. L.; ALI-AL-AHMAD, M. Z.; CHEBLOUNE, Y.; GALLEGOS-SÁNCHEZ, J.; LAMARA, A.; PÉPIN, M.; FIENI, F. The risk of small ruminant lentivirus (SRLV) transmission with reproductive biotechnologies: State-of-the-art review. **Theriogenology**, v. 79, p. 1-9, 2013.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v. 207, n. 29, p. 997-999, 1980.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 178, n. 7, p. 713-719, 1981.

CROSS, R. F.; SMITH, C. K.; MOORHEAD, P. D. Vertical transmission of progressive pneumonia of sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 465-8, 1975.

CRUZ, J. C. M.; GOUVEIA, A. M. G.; SOUZA, K. C.; BRAZ, G. F.; TEIXEIRA, B. M.; HEINE-MANN, M. B.; LEITE, R. C.; REIS, J. K. P.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. **Small Ruminant Research**, v. 85, p. 149–152, 2009.

CUNHA, R. G.; NASCIMENTO, M. D. Ocorrência de anticorpos para o vírus da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 72-75, 1995.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, D.; SCHMERR, M. J. F.; BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 17, p. 237-250, 1988.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: food animal practice**, v. 13, p. 12-33, 1997.

DIRKSEN, G.; GRUENDER, H. D.; STOEBER, M. **Rosenberger: exame clínico dos bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1993.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; MADEWELL, B. R.; FLOYD, K. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 190, p. 182-186, 1987.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v. 10, n. 3, p.251-262, 1993.

EAST, N. E. Caprine arthritis encephalitis. In: SMITH, B. P. (Ed.). **Large animal internal medicine**. St. Louis: Mosby, 1996. p.1147-1148.

EGGERT-KRUSE, W.; BOTZL, I.; POHL, S.; ROHR, G.; STROWITZKI, T. Antimicrobial activity of human cervical mucus. **Human Reproduction**, v. 15, p. 778-84, 2000.

ELLIS, T. M.; ROBINSON, W. F.; WILCOX, G. E. Characterisation, experimental infection and serological response to caprine retrovirus. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 11, p. 321-326, 1983.

ELLIS, T. M.; CARMAN, H.; ROBINSON, W. F.; WILCOX, G. E. The effect of colostrum-derived antibody on neonatal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 8, p. 242-245, 1986.

ELLIS, T. M.; ROBINSON, W. F.; WILCOX, G. E. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 3, p. 69-73, 1988.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **FAO statistical yearbook**. 2010. Disponível em:
<http://www.fao.org/docrep/015/am081m/am081m00.htm#Contents_en>. Acesso em: 25 ago. 2010.

FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R.; CUNHA, R. M. S.; LIMA, J. P. M. S.; ANDRIOLI, A.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; PINHEIRO, D. C. S. N. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 94, p. 205–209, 2010.

FERNANDES, M. A.; ARAÚJO, W. P.; CASTRO, R. S. Prevalência da infecção pelo vírus Maedi-Visna em ovinos da Microrregião grande São Paulo, estado de São Paulo. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v. 6, n. 1, p. 23-28, 2003.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (Caev) infected cells in flushing media following oviductal-stage embryo collection. **Theriogenology**, v. 57, p. 931–940, 2002.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G. Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of super- ovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v. 59, p. 1515–1523, 2003.

FIENI, F.; PELLERINA, J. L.; ROUX, C.; POULIN, N.; BARIL, G.; FATET, A.; VALAS, S.; CHATAGNON, G.; MERMILLOD, P.; GUIGNOT, F. Can caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) be transmitted by in vitro fertilization with experimentally infected sperm? **Theriogenology**, v. 77, p. 644–651, 2012.

FRANKE, C. R. **Controle sanitário da artrite-encefalite caprina**. Salvador: EDUFBA, 1998. 70 p.

FROTA, M. N. L.; SILVA, J. B. A.; ARAUJO, S. A. C. Artrite Encefalite Caprina em cabritos de rebanhos com programa de controle no Estado do Ceara. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2. p. 147-152, 2005.

GARCIA, M. Artrite encefalite caprina: uma nova doença no Brasil. **A hora veterinária**, v. 13, n. 76, p. 57-59, 1993.

GLARIA, I.; REINA, R.; CRESPO, H.; DE ANDRÉS, X.; RAMÍREZ, H.; BIESCAS, E.; PÉREZ, M. M.; BADIOLA, J.; LUJÁN, L.; AMORENA, B.; DE ANDRÉS, D. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 156-162, 2009.

GOETHE, J. W. V. **Pensador**. 2014. Disponível em: <<http://pensador.uol.com.br/frase/MTI3NA/>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

GOGOLEWSKI, R. P.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C. Antigenic cross reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 1233-1240, 1985.

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

GONZALEZ, L.; GELABERT, J. L.; MARCO, J. C. SAEZ-DE-OKARIZ, C. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. **Veterinary Record**, v. 120, p. 102-109, 1987.

GONZALES, J. V. C.; DOMINGO, C. Y. J.; ABES, N. S.; GUTIERREZ, C. A.; VILLANUEVA, M. A.; MINGALA, C. N. Concordance of competitive enzyme linked immunosorbent assay and nested-polymerase chain reaction in the detection of caprine arthritis-encephalitis virus. **Small Ruminant Research**, v. 115, n. 1, p. 134-139, 2013.

GREENWOOD, P. L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 22, n. 1-2, p. 71-87, 1995.

GREGORY, L.; SILVA, L. C. L. C.; ANGELINI, M.; LARA, M. C. C. S. H.; FRANCHINI, M. L.; RIZZO, H.; CARDOSO, M. V.; BENESI, F. J.; CASTRO, R. S. Avaliação clínica de caprinos acometidos por artrite. Diferencial entre artrite viral (CAE) e bacteriana (*Mycoplasma* spp.) em dois casos atendidos no hospital veterinário da FMVZ-USP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 247-249, 2006.

GREGORY, L.; LARA, M. C. C. S. H.; VILLALOBOS, E. M. C.; HASEGAWA, M. Y.; CASTRO, R. S.; RODRIGUES, J. N. M.; ARAUJO, J.; KELLER, L. W.; DURIGON, E. L. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina em amostras de leite de cabras pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e nested-PCR. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 142-146, 2009.

GUEDES, M. I. M. C.; SOUZA, J. C. A.; GOUVEIA, A. M. G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53 n. 1, p. 51-54, 2001.

HASEGAWA, M. Y. **Estudo comparativo entre as formas clínicas e relação com as variantes do vírus da Artrite-Encefalite Caprina isoladas do Estado de São Paulo**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

HECKERT, R. A.; McNAB, W. B.; RICHARDSON, S. M.; BRISCOE, M. R. Evaluation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the detection of antibodies to Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in goat serum. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 3, p. 237-241, 1992.

HERRMANN, L. M.; CHEEVERS, W. P.; McGUIRE, T. C.; ADAMS, D. S.; HUTTON, M. M.; GAVIN, W. G.; KNOWLES, D. P. Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 267-271, 2003.

HERRMANN-HOESING, L. Diagnostic assays used to control small ruminant lentivirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 843-855, 2010.

HOFF-JÖRGENSEN R. Slow virus infections with particular reference to Maedi-Visna and enzootic bovine leukaemia. **Veterinary Research Community**, v. 1, p. 251-63, 1977.

HOFMANN, A.; ZKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER A. Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. **Biology Reports**, v. 71, p. 405-409, 2004.

HOUWERS, D. J.; GIELKENS, A. L. J.; SCHAAKE, JR. J. An indirect enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to MAEDI-VISNA virus. **Veterinary Microbiology**, v. 7, p. 209-219, 1982.

HOUWERS, D. J.; SCHAAKE JR. J. An improved ELISA for detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in one-step assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 98, p. 151-154, 1987.

HOUWERS, D. J.; VAN DER MOLEN, E. J. A five-year serological study of natural transmission of maedi-visna virus in a flock of sheep, completed with post mortem investigation. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 34, p. 421-431, 1987.

HUSSO, L. D.; NARAYAN, O.; HART, W. G. Salic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **Journal of Virology**, v. 62, p. 1974-1980, 1988.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção pecuária municipal 2010**. IBGE, Seção Estatística. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/comentarios.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **ICTV master species list**. 2005. ICTV, 8th Report. 2005. Disponível em: <<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB//00.061.1.06.007.htm>>. Acesso em: 25 maio 2012.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B; NARAYAN, O. Lentiviroses. In: FIELDS, M. D.; KNIPE, **Virology**, 3a Ed. New York: Raven Press, 1996. p.1977-1996.

JOHNSON, C. G.; BARBET, A. F.; KLEVJER-ANDERSON, P. Preferencial immune response to virion surface glycoproteins by caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 657-665, 1983.

KLEVJER-ANDERSON, P.; MCGUIRE, T. C. Neutralizing antibody response of rabbits and goats to caprine arthritis-encephalitis virus. **Infectious Immunology**, v. 38, p. 455-461, 1982.

KNOWLES, D. P. JR.; CHEEVRES, W.; MCGUIRE, T. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with caprine arthritisencephalitis virus. **Journal of Virology**, v. 64, n. 5, p. 2396-2398, 1990.

KNOWLES, D. JR.; CHEEVRES, W. P.; McGUIRE, T. C. Structure and variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. **Journal of Virology**, v. 65, n. 11, p. 5744-5750, 1991.

KNOWLES, D. P. Laboratory diagnostic test for Retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinics of North American: food animal practice**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 1997.

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

LAMARA, A.; FIENI, F.; CHEBLOUNE, T.; TAINURIER, D. In vitro susceptibility of goat granulosa cells to caprine arthritis-encephalitis virus: preliminary results. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 320, 2000.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v. 79, p. 165–172, 2001.

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

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159–174, 1977.

LANYON, S. R.; HILL, F. I.; REICHEL, M. P.; BROWNLIE, J. Bovine viral diarrhoea: pathogenesis and diagnosis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 201–209, 2014.

LARA, M. C. C. S. H. **Artrite-encefalite dos caprinos** – Aspectos clínicos e epidemiológicos. 2002. 247 f. Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E. H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 736-740, 2005.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Possibility of vertical transmission of caprine arthritis- encephalitis vírus in neonate kids. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 4, p. 553-555, 2005.

LERONDELLE, C.; FLEURY, C.; VIALARD, J. Le gland mammaire: organe cible de l'infection par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 20, n. 1, p. 57-63, 1989.

LERONDELLE, C.; GREENLAND, T.; JANE, M.; MORNEX, J. F. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 4, p. 850-855, 1995.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Instillation of primary culture of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v. 30, n. 5, p. 467-74, 1999.

LEROUX, C.; VUILLERMOZ, S.; MORNEX, J. F.; GREENLAND, T. Genomic heterogeneity in the pol region of ovine lentivirus obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1533-1537, 1995.

LICHTENSTEIGER, C. A.; CHEEVERS, W. P.; DAVIS, W. C. CD8+ cytotoxic Tlymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis encephalitis virus. **Journal General of Virology**, v. 74, p.2111-2116, 1993.

McGUIRE, T. C.; NORTON, L. K.; O'ROUKE, K. L.; CHEEVERS, W. P. Antigenic variation of neutralization sensitive epitopes of caprine arthrititis-encephalitis lentivirus during persistent infection. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 62, p. 3488-3492, 1988.

MELO, A. C. M.; FRANKE, C. R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da artriteencefalite caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da Grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 113-117, 1997.

MELO, C. B.; DE CASTRO, R. S.; OLIVEIRA, A. A.; FONTES, L. B.; CALLADO, A. K. C.; NASCIMENTO, S. A. Estudo preliminar sobre a infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos e caprinos de Sergipe. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 5., Salvador. **Anais...** Salvador: SBB, 2003. p. 47-48.

MINARDI, J. C. **Monitoramento sorológico e da presença do DNA pró-viral do lentivirus caprino (CAEV) no sangue e sêmen de reprodutores infectados.** 2009. 35 p. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2009.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhoea virus. **The Veterinary clinics of North America: food animal practice.** v. 11, n. 3, p. 477-487, 1995.

MOOJEN, V.; CORREA SOARES, C.; RAVAZZOLO, A. P.; DAL PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (MAEDI/VISNA - Artrite-encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 14, n. 14, p. 77-78, 1986.

MOOJEN, V. Maedi-Visna dos ovinos. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. (Ed.) **Doenças dos ruminantes e dos equinos.** São Paulo: Varela, 2001.

MORNEX, J. F.; LENA, P.; LOIRE, R.; COZON, G.; GREENLAND, T.; GUIGUEN, F.; JACQUIER, M. F.; CORDIER, G. Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. **Veterinary Research**, v. 25, p. 478-488, 1994.

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

MURPHY, B.; MCELLIOTT, V.; VAPNIARSKY, N.; OLIVER, A.; ROWE, J. Tissue tropism and promoter sequence variation in caprine arthritis encephalitis virus infected goats. **Virus Research**, v. 151, n. 2, p. 177-184, 2010.

NAKAGAWA, M.; MOTOI, Y.; IIZUKA, M.; AZUMA, R. Histopathology of enzootic chronic polyarthritis of goats in Japan. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v. 11, p. 191-200, 1971.

NARAYAN, P.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J.; HESS, J. Lack of neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated Mycobacterium tuberculosis. **Journal of Virology**, v. 49, p.349-355, 1984.

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: Chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 7, p. 89-97, 1985.

NARAYAN, O.; CORK, L. C. (Ed.). Caprine arthritis-encephalitis virus. In: DINTER, Z.; MOREIN, B. **Virus infections of ruminants**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 1990. p. 441-452.

NARAYAN, O.; ZINK, C. M.; GORREL, M.; McENTEE, M.; SHARMA, D.; ADAMS, R. Lentiviruses induced arthritis in animals. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 25-32, 1992.

NASH, J. W.; HANSON, L. A.; COATS, K. C. Bovine immunodeficiency virus in stud bull semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 760-763, 1995.

NORMAN, S.; SMITH, M. C. Caprine arthritis-encephalitis: review of the neurologic form in 30 cases. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 182, p. 1342-1345, 1983.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standards diagnostic tests and vaccines**. 5. ed. Paris: OIE; World Organization for Animal Health, 2004. p. 1178.

OLIVEIRA, M. M. M.; CASTRO, R. S.; CARNEIRO, K. L.; NASCIMENTO, S. A.; CALLADO, A. K. C.; ALENCAR, C. S. A.; COSTA L. S. P. Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos e ovinos em abatedouros do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 947-949, 2006.

OWINY, J. R.; GILBERT, R. O.; WAHL, C. H.; NATHANIELSZ, P. W. Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 2, p. 593-596, 1995.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J. F. S.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L.; SOUZA, K. C. de; ALVES, F. S. F.; CAMPELLO, C. C.; RICARTE, A. R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Profile of the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 85, n. 1, p. 27-33, 2009.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. F.; PETERHANS, E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. **Veterinary Research**, v. 29, n. 3-4, p. 341-367, 1998.

PEREIRA, M. F. **Artrite-encefalite caprina a vírus (CAE) – estudo anatomopatológico e imunohistoquímico em cabras naturalmente infectadas**. 1995. 64 p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Medicina Veterinária UFMG, Belo Horizonte, Belo Horizonte, 1995.

PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. LE C. A. E. V.: revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 144, p. 93-98, 1993.

PERK, K. Ungulate lentiviruses: pathogenesis and relationship to AIDS. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 32, p. 97-127, 1988.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA, B.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R. A.; KRASSNIG, R.; LAFONT, J. P.; LENIHAN, P.; PETURSSON, G.; PRITCHARD, G.; THORLEY, J.; VITU, C.; MORNEX, J. F.; PEPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v. 35, p. 257–274, 2004.

PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. **Theriogenology**, v. 69, p. 433–442, 2008.

PÉTURSSON, G.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; ANDRÉSSON, O. S.; GEORGSSON, G.; PÁLSSON, P. A.; RAFNAR, B.; TORSTEINSDÓTTIR, S. Lentivirus diseases of sheep and goats: Maedi-visna and Caprine arthritis-encephalitis. In: SPEEDY, A. W. **Progress in sheep and goat research**. [S.l.]: Redwood Press, 1992. chap. 2.7.3/4, p. 107- 129.

PREZIUSO, S.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; RENZONI, G.; BRACA, G. Experimental maedi visna virus infection in sheep: a morphological, immuno- histochemical and PCR study after three years of infection. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 373–378, 2003.

PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; GIRÃO, E. S.; MEDEIROS, L. P. A.; GIRÃO, R. N. Presença da Artrite-Encefalite Caprina a Vírus (CAEV), em Teresina – Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., Goiânia. **Anais...** Goiânia. 1996. p.161.

PINHEIRO, R. R. **Vírus da Artrite encefalite caprina: Desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará**. 2001. 115 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

QUAYLE, A. J.; XU, C.; MAYER, K. H.; ANDERSON, D. J. T lymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are a significant source of human immunodeficiency virus in semen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 960-968, 1997.

RAMALHO, E. **Artrite encefalite caprina – CAE: Prevalência de anticorpos séricos em caprinos no Estado da Bahia**. 2000. 109 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RAVAZZOLO, A. P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Southern Brazil. **Virus Research**, v. 79, p.117–123, 2001.

REDDY, P. G.; SAPP, W. J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 3042-3043, 1993.

REILLY, L. K.; BAIRD, A. N.; PUGH, D. G. Diseases of the musculoskeletal system, In: PUGH, D.G. **Sheep & Goat Medicine**. Philadelphia: Saunders, 2002. p. 239-240.

REINA, R.; BERRIATUA, E.; LUJÁN, L.; JUSTE, R.; SÁNCHEZ, A.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. **The Veterinary Journal**, v. 182, p. 31–37, 2009.

REISCHAK, D. **Lentivírus de pequenos ruminantes: imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos e caprinos**. 2000. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. São Paulo. Nobel, 1997. 318 p.

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

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

ROBINSON, W. F.; ELLIS, T. M. The pathological features of an interstitial pneumonia of goat. **Journal of Comparative Pathology**, v. 94, p. 55-64, 1984.

ROBINSON, W. E.; ELLIS, T. M. Caprine arthritis-encephalitis virus infection: from recognition to eradication. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 8, p. 237-241, 1986.

ROSADIO, R.; RIVERA, H. Mastitis intersticial linfoide asociada al virus de la artritisencefalitis caprina. **Revista de Investigacion Pecuaria**, v. 6, n. 2, p. 119-123, 1993.

ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THURMOND, M. C.; FRANTI, C. E. Risk factors associated with Caprine Arthritis-Encephalitis virus infection in goats on California dairies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, p. 510-514, 1991.

ROWE, J. D.; EAST, N. E.; FRANTI, C. E.; THURMOND, M. C.; PEDERSEN, N. C.; THEILEN, G. H. Risk factors associated with the incidence of seroconversion to caprine arthritis-encephalitis virus in goats on California dairies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 2396-2403, 1992.

ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Clinics of North American: food animal practice**, v. 13, p. 35-53, 1997.

ROWE, J. D. Epidemiology of the CAEV: horizontal transmission of the virus. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, WVA, 26., 1999, Lyon, France. **Proceedings...** Lyon, France, 1999.

RUSSO, P.; VITU, C.; BOURGOGNE, A.; VIGNONI, M.; ABADIE, G.; DAVID, V.; PÉPIN, M. Caprine Arthritis-Encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. **Veterinary Record**, v. 140, p. 483-484, 1997.

RUTKOSKI, J. K.; WERENICZ, R.; REISCHAK, D.; WENDELSTEIN, A. C.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A. P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com “primers” degenerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 635-640, 2001.

SALLES, H. O.; ANDRIOLI, A.; SOARES, A. S.; SOBRINHO, P. A. M. Influência da artrite encefalite caprina na resposta superovulatória. **Ciência Rural**, v. 8, n. 1, p.37-40, 1998.

SAMAN, E.; VAN EYNDE, G.; LUJAN, L.; EXTRAMIANA, B.; HARKISS, G.; TOLARI, F.; GONZÁLEZ, L.; AMORENA, B.; WATT, N.; BADIOLA, J. A new sensitive serological assay for detection of lentivirus infections in small ruminants. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, p. 734-740, 1999.

SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos**: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle. Sobral: Brasília, 1996. 220 p.

SANTOS, L. M. M.; NASCIMENTO, E. R.; ALMEIDA, J. F.; MEIRELLES, K. C.; CASTRO, R. S.; PEREIRA, V. L. A. Detecção da infecção pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) pela imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e reação em cadeia da polimerase (PCR). **Ciência Animal Brasileira**, 2009. Suplemento 1. Trabalho apresentado no Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; PEREIRA, M. F. Estudo clínico, anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 4, p. 415-424, 1996.

SCHROEDER, B. A.; OLIVER, R. E.; CATHCART, A. The development and evaluation of an ELISA for detection of antibodies to Caprine Arthritis-encephalitis virus in goat serum. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 33, p. 213-219, 1985.

SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J. B.; VOGT, H. R.; MUHLHERR J.; ZANONI R.; MISEREZ R.; LUTZ H.; SCHUPBACH J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. **Virology**, v. 319, p.12–26, 2004.

SILVA, J. S.; CASTRO, R. S.; MELO, C. B.; FEIJÓ, F. M. C. Infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Rio Grande do Norte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 727-731, 2005.

SILVA, J. B. A. **Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas**. 2006. 143 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2006.

SILVA, M. L. C. R.; CASTRO, R. S.; MAIA, R. C.; NASCIMENTO, S. A.; GOMES, A. L. V.; AZEVEDO, S. S. Lentivírus em caprinos leiteiros do semiárido paraibano: prevalência de anticorpos, fatores de risco e detecção molecular. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1-6, 2013.

SIMS, L. D.; HALE, C. J.; McCORMICK, B. M. Progressive interstitial pneumonia in goats. **Australian Veterinary Journal**, v. 60, n. 12, p. 368-371, 1983.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina veterinária interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. p. 1138-1139.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Caprine arthritis encephalitis. In: _____. **Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p. 73-79.

SMITH, M. C.; CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 193, n. 1, p. 63-67, 1988.

SOUZA, K. C. de. **Artrite-encefalite caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Sobral, CE, 2010.

SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O.; BRITO, R. L. L.; RODRIGUES, A. S.; SIDER, L. H.; PAULA, N. R. O.; AVILA, A. A.; CARDOSO, J. F. S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research**, v. 109 p. 193–198, 2013.

STAVROU, D.; DEUTSCHLANDER, N.; DAHME, E. Granulomatous encephalomyelitis in goats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 79, p. 393-396, 1969.

STÜNZI, H.; BUCHI, H. F.; LE ROY, H. L. Endemische Arthritis chronica bei Ziegen. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 106, p. 778-788, 1964.

SUNDQUIST, B.; JÖNSSON, L.; JACOBSSON, S. O.; HAMMARBERG, K. E. Visna virus meningoencephalomyelitis in goats. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 22, n. 3-4, p. 315-330, 1981.

TEIXEIRA, M. F. S. **Replication in vitro des lentivirus des petits ruminants dans des lignées fibroblastiques caprines immortalisées**. 1996. 157 p. Thèse (Doctorat) - Université Claude Bernard-Lyon, 1996. I. No d'ordre: 157/96,

TIGRE, D. M.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Isolamento e identificação do Vírus da Artrite Encefalite Caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 5, n. 2, p. 124–131, 2006.

TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998. 545 p.

THIBAULT C. La fécondation. In: THIBAULT, C.; ET LEVASSEUR, M. C. **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Paris, France: Ellipses & INRA editions, 2001. chap. 17, p. 367-389.

TRALDI, A. S.; LOUREIRO, M. F. P.; CAPEZZUTO, A.; MAZORRA, A. L. Métodos de controle da atividade reprodutiva em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 254-260, 2007.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; DA SILVA, A.; PERRIN, G. Detection of caprine arthritis encephalitis virus in sperm of experimentally infected bucks. **Veterinary Research**, v. 29, p. 579–584, 1998.

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

VITU, C.; RUSSO, P.; FILIPPI, P.; VIGNE, R.; QUERAT, G.; GIAUFFRET, A. Une technique ELISA pour la detection des anticorps anti-virus maedi-visna. Etude comparative avec l'immunodiffusion en gelose et la fixation du complement.

Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, v. 5, p. 469-481, 1982.

VON MOCKENHAUPT, C.; BAUER, K. Untersuchungen zur Caprinen Arthritis-Enzephalitis in Bayern und der einfluss seuchen-hygienischer massnahmen auf den Verlauf dieser Krankheit. **Tierärztliche Umschau**, v. 42, n. 12, p. 966-970, 1987.

WAGTER, L. H.; JANSEN, A.; BLEUMINK-PLUYM, N. M.; LENSTRA, J. A.; HOUWERS, D. J. PCR detection of lentiviral GAG segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. **Veterinary Research Communication**, v. 22, p. 355-362, 1998.

WILKERSON, M. J.; DAVIS, W. C.; CHEEVERS, W. P. Peripheral blood and synovial fluid mononuclear cell phenotypes in lentivirus induced arthritis. **Journal of Rheumatology**, v. 22, n. 1, p. 8-15, 1995.

WOODARD, J. C.; GASKIN, J. M.; POULOS, P. W.; MACKAY, R. J.; BURRIDGE, M. J. Caprine arthritis- encephalitis: Clinicopathologic study. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 2085-2096, 1982.

ZANONI, R.; KRIEG, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to caprine arthritis encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 580-582, 1989.

ZANONI, R. G.; VOGT, H. R.; POHL, B.; BÖTTCHER, J.; BOMMELI, W.; PETERHANS, E. An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 41, p. 662-669, 1994.

ZANONI, R. G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. **Journal of General Virology**, v. 79, pt. 8, p. 1951-1961, 1998.

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

ZWAHLEN, M.; AESCHBACHER, M.; BALCER, Th.; STUCKI, M.; WYDERWALTHER, M.; WEISS und STECK, F. Lentivirusinfektionen bei Ziegen mit Carpititis und interstitieller Mastitis. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 125, p. 281-299, 1983.