

Detecção de sequências do DNA proviral do vírus da Artrite Encefalite Caprina em saliva*

Detection of Proviral Sequences of the Caprine Arthritis Encephalitis Virus in Saliva

Kelma Costa de Souza¹, Alice Andrioli², Lucia Helena Sider², Raymundo Rizado Pinheiro², Rosivaldo Quirino Bezerra Junior¹, Renato Mesquita Peixoto¹ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹

ABSTRACT

Background: Goats can be infected by a lentivirus called the caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) that causes an infectious disease characterized by a chronic. For replication, the CAEV, integrate as a provirus in the DNA of the host cell genome. By consequence, infection of cells persistent life-long infection of the animal. The CAEV can be found in most body fluids, It has been demonstrated its presence in blood, milk, semen. However, the search for the CAEV in other body fluids besides blood is important to assess possible viral transmission. The aim of this study was to determine whether the presence of proviral DNA sequences in saliva of animals infected.

Materials, Methods & Results: The study was carried out on the farm belonging to the Embrapa Goat and Sheep Research Center, located in the municipality of Sobral, Ceará, Brazil. To assess the oral fluid for the presence of CAEV, samples of saliva from eight infected breeders were collected by suctioning saliva from the oral cavity on the side region of the breeders lower molar teeth using a probe coupled to a plastic 5 mL syringe. And pro-viral DNA was extracted from the samples using NaCl and proteinase K. Two rounds of polymerase chain reaction (nested PCR) were carried out to amplify the final 187 pb fragment of the pro-viral DNA. All the oligonucleotide primers were determined from the gag region of the structural gene of the CAEV-Cork. The fragments amplified by PCR were analyzed in electrophoresis in a horizontal cube. On 2% agarose gel and stained with ethidium bromide (10µg/µL). The products of the PCR amplification were sequenced in platform Applied Biosystems, the sequences were compared to available GenBank strains, and the results of this comparison demonstrated that were more related to the caprine strains regional. The presence of pro-viral DNA was observed in saliva in of 100% animals and proved that saliva of infected goats contained the CAEV. However, when assessing the results of CAEV pro-viral DNA detection in the present study, it was observed variation in the detection frequency of lentivirus in samples collected at different times.

Discussion: This finding indicated that the CAEV was present in saliva samples in its pro-viral form, a factor that would not limit its contagion capacity and that direct, continued exposure in a favorable environment presents perfect conditions for its transmission by this pathway. The results found in the present study corroborated studies on other lentivirus. Isolated the maedi-visna virus (MVV) in saliva glands of experimentally infected sheep. In cats, the feline immunodeficiency virus (FIV) was also detected in the saliva of infected animals and transmission was reported. In a recent study, was detected the presence of the lentivirus in small ruminants by PCR in water and air samples in different installations that housed herds with medium to high infection prevalence. Throughout in this study, an intermitency in proviral elimination was observed in saliva similar blood and semen, as reported by other authors for CAEV and other virus. Although the determining mechanism of horizontal transmission through the oral fluids was not definitively elucidated, these studies highlight the risks of transmission through direct contact with animals or indirect contamination by food and/or water in the drinker. This study proved that saliva from infected goats contains the CAEV, more studies should be carried out to analyze the degree of infectiousness of the virus in the saliva and the viral elimination characteristics in this medium.

Keywords: CAEV, detection, PCR, saliva, transmission.

Descritores: CAEV, detecção, PCR, saliva, transmissão.

INTRODUÇÃO

Os lentivírus responsáveis pela Artrite-encefalite Caprina (CAEV) e Maedi-Visna (MVV) pertencem à família *Retroviridae*, são complexos não oncogênicos, e intimamente relacionados fenotípica, biológica e antigenicamente, o que os insere no conceito de *quasispecies virais* [13]. São agrupados como Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR). Esses vírus geralmente limitam a infecção a um simples hospedeiro, acarretando sérios problemas ou mesmo à morte; multiplicam-se em células em repouso (não ativadas); infectam monócitos, macrófagos e/ou linfócitos, determinando infecção persistente e multisistêmica e apresentam alta taxa de mutação [19].

Os LVPR podem ser encontrados na maior parte dos fluídos corporais, e o CAEV na forma proviral já foi detectado em sangue [15], leite [18] e sêmen [2,6], com ocorrência de transmissão. Porém, deve-se atentar a presença deste agente em outras partes do corpo, como na mucosa oral. Nos ovinos, por exemplo, o MVV foi isolado na saliva e em secreções nasais [11]. Em gatos, o agente da imunodeficiência felina (FIV), outro lentivírus, foi detectado na saliva de animais infectados, com transmissão comprovada [25]. E em humanos, detecções do DNA do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em células de mucosa oral [17] e do herpesvírus em fluido de lavagem oral [5] sugerem que células epiteliais, em outras áreas do corpo, podem ser infectadas. Nos caprinos os estudos são incipientes, contudo, sequências virais já foram identificadas em água de bebedouros e no ar expirado por animais infectados [24]. Assim, este trabalho tem o objetivo de estabelecer a presença do DNA proviral do CAEV na saliva de animais infectados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram estudadas amostras de saliva de dez machos caprinos alojados em baias e mantidos em sistema intensivo de criação, pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa Caprinos e Ovinos.

Cada animal foi avaliado pré-experimento em vários momentos, através dos testes de *western blotting* (WB) e reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue, por se tratar de um programa de controle adotado no rebanho. Dois grupos então foram selecionados, o

grupo G1 (n = 8) composto por animais positivos e o G2 (n = 2) com animais negativos como controle.

Amostras

As amostras de saliva foram coletadas com os animais em jejum de 12 h, e obtidas através de sucção do fluído da cavidade oral na região lateral dos dentes molares inferiores. O aparato utilizado constava de uma sonda acoplada a uma seringa plástica de 5 mL. Após as coletas as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e armazenadas a 4°C até o momento da extração de DNA.

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), um total de sete coletas por animal foi realizada, havendo intervalo entre elas com o objetivo de avaliar o comportamento de eliminação do vírus na saliva. As três primeiras coletas ocorreram mensalmente, após estas semanalmente.

Extração de DNA

O método de extração do DNA proviral utilizado nas amostras foi baseado na utilização do NaCl e da proteinase K [1]. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Ultrospec™ 2100 pro)¹.

Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR)

Para a PCR foram realizados dois rounds de PCR (nPCR) para amplificar um fragmento final de 187 pb do DNA proviral do CAEV. Todos os oligonucleotídeos iniciadores foram determinados a partir da região do gene estrutural *gag* da amostra padrão CAEV-Cork [21] (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler ep Gradient 5341)² em um volume final de 50 µL. Estas consistiam de tampão Tris HCl - 10 mM (pH 8,3)³; KCl - 500 mM³; MgCl₂ - 25 mM³; Gelatina - 0,001% (w/v)³; dNTP - 100 µM³ (de cada); Primers - 20 pmol (de cada); Taq DNA polimerase - 2U³; Target DNA 3 µL e água livre de DNase autoclavada 50 µL q.s.p.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial 94°C por cinco min, seguida de 35 ciclos: desnaturação 94°C por um min, anelamento 63°C por um min, extensão 72°C por 45s, seguida de uma adicional extensão final de 72°C por sete min. Para cada *round* de amplificação foi utilizado um controle positivo, referente amostra padrão de DNA proviral CAEV Cork derivada do cultivo de células de membrana sinovial de caprinos infectados, amostra de DNA de animal negativo e para controle de qualidade

das ampliações, água livre de DNase. Seguiu-se metodologia de Barlough *et al.* [3] com modificações sugeridas por Andrioli *et al.* [2].

Os fragmentos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em cuba horizontal. Uma alíquota de 10µL de cada amostra mais 2µL do tampão de carregamento foi disposta em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (10µg/µL). As bandas foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (Benchtop™ UV)⁴ e fotodocumentadas. Os

tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados ao padrão de peso molecular 100pb DNA ladder (TrackIt™)⁵ e ao controle positivo.

Sequências de DNA

As amostras positivas foram purificadas em gel de agarose a 1%, usando kit comercial (BigDye Terminator v3.1)⁶ e sequenciadas em plataforma ABI 35007. As sequências do gene foram comparadas com MEGA⁶ software de análise, e Basic Local Alignment Search Tool - Blast.

Tabela 1. Sequências dos primers usados na reação de nPCR, com o tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene	Primers	Sequências		Fragmentos (pb)
		5'	3'	
Gag	Gag1	CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG		296
	Gag2	TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC		
1º. round	Gag3	GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG		187
	Gag4	ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC		

RESULTADOS

O DNA proviral do CAEV foi detectado na saliva em 100% (8/8) dos animais pertencentes ao G1. Seis animais apresentaram pelo menos dois resultados positivos na nPCR, por amplificarem um fragmento de 187 bp do provirus correspondente ao gene *gag* do CAEV. Exceto os animais A e B (Tabela 2) que vieram a óbito antes da segunda coleta devido à cronicidade da doença. Com relação ao grupo controle nenhum animal apresentou resultado positivo (Figura 1).

Avaliando os resultados por coleta observou-se que 25% (2/8) dos animais amplificaram o fragmento do DNA proviral na primeira coleta. Na segunda, dos seis animais infectados restantes, nenhum apresentou resultado positivo. Já nas coletas subsequentes, 33,3% (2/6), 66,6% (4/6), 16,6% (1/6), 16,6% (1/6) e 100% (6/6) dos animais apresentaram o provírus na saliva.

Verificou-se intermitência entre as análises ocorrendo resultados positivos e negativos para o mesmo animal, em momentos diferentes. Sendo que 33,3% (2/6) apresentaram três vezes salivas positivas para o CAEV, e 66,6% (4/6) apresentaram positividade duas vezes (Tabela 2).

Na análise das sequências, verificou-se 100% de convergência e 99% de identidade com as

sequências CAEV10, CAEV09, CAEV08, CAEV07, CAEV06, CAEV05, CAEV04, CAEV03, CAEV02, CAEV01, BR/CNPC-G1, BR/CNPC-G2, BR/CNPC-G3, BR/CNPC-G4 (sequências de LVPR isoladas em animais de rebanhos do Nordeste do Brasil), CAN_23-18CAEV, e CAEV-Cork, obtidas no GenBank numeradas em: JQ290327.1[7], JQ290326.1[7], JQ290325.1[7], JQ290324.1[7], JQ290323.1[7], JQ290322.1[7], JQ290321.1[7], JQ290320.1[7], JQ290319.1[7], JQ290318.1[7]., EU300979.1[8], EU300978.1[8], EU300977.1[8], EU300976.1[8], KC241951.1[22], e M33677.1[21]., respectivamente.

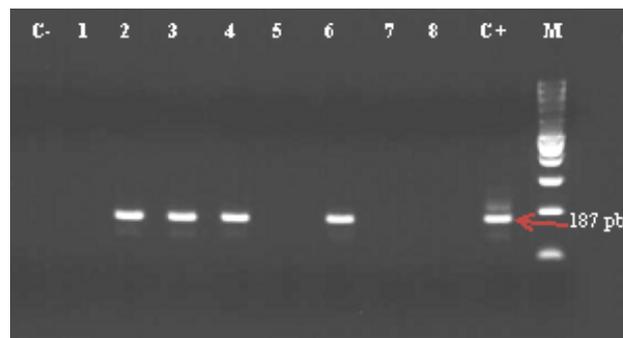


Figura 1. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, apresentando produtos da amplificação do fragmento-alvo do DNA proviral do CAEV equivalente a 187pb. M (marcador DNA ladder 100pb); 1,5 (amostras negativas dos animais positivos); 2, 3, 4 e 6 (amostras positivas dos animais positivos) 7 e 8 (amostras negativas dos animais controles); C+ (controle positivo da reação); C- (controle negativo da reação).

Tabela 2. Resultados positivos e negativos obtidos nos testes de nestedPCR para o DNA proviral do CAEV na saliva dos animais dos diferentes grupos nas sete coletas.

Animal	Grupo	Coletas						
		1	2	3	4	5	6	7
*A	G1	+	—	—	—	—	—	—
*B	G1	+	—	—	—	—	—	—
C	G1	-	-	+	+	-	-	+
D	G1	-	-	-	+	-	-	+
E	G1	-	-	-	+	-	-	+
F	G1	-	-	+	-	+	-	+
G	G1	-	-	-	+	-	-	+
H	G1	-	-	-	-	-	+	+
I	G2	-	-	-	-	-	-	-
J	G2	-	-	-	-	-	-	-

*Animais que foram a óbito antes da segunda coleta; G1- grupo de animais positivos para a CAE; G2- grupo de animais negativos para a CAE; (—) não houve coleta; (+) resultado positivo; (-) resultado negativo.

DISCUSSÃO

A positividade no *nPCR* para o CAEV na saliva a partir da constatação do DNA proviral, apontaram que leucócitos e/ou células epiteliais de descamação encontradas neste meio podem ser produtivamente infectadas pelo vírus. Na avaliação do sequenciamento encontrou-se alta relação com sequências de cepas de LVPR regionais [7,8] e ao genoma completo da cepa CAEV-Co [21] disponíveis no GenBank. Desse modo, a extração de DNA a partir da saliva total ou células bucais pode ser utilizada para a pesquisa da infecção, para maior conhecimento da etiopatogenia da enfermidade, bem como para o estudo da possibilidade de transmissão oral a partir de certas concentrações e quais as circunstâncias de maior vulnerabilidade.

Sequências virais dos LVPR foram recentemente detectadas em amostras de água e ar, coletadas em instalações de rebanhos com prevalência média a alta da infecção [24]. Muito provavelmente os bebedouros foram infectados pelas secreções que continham o vírus. Os mencionados autores ressaltaram que a forma proviral foi a mais frequente entre as detecções. Fato que não limitaria sua capacidade infecciosa, mas pode afetar sua resistência às condições ambientais, e uma exposição próxima e contínua em ambiente favorável pode oferecer condições para sua transmissão [12].

Num estudo com oito ovelhas sadias mantidas em contato direto com cabras soropositivas o CAEV foi capaz de infectá-las. Das oito ovelhas, seis (75%) apresentaram resultados positivos na *nPCR* no sangue. Em cinco (62,5%), detectou-se o DNA proviral do CAEV já aos 30 dias de confinamento [23]. Sabe-se que os

caprinos têm um comportamento característico como bufar e/ou tossir ao se alimentarem ou beberem, liberando descargas nasais e/ou orais, o que pode favorecer a disseminação do vírus. Ademais, evidências epidemiológicas apontam para a importância de transmissão por aerossóis, e que secreções de órgãos-alvo contendo macrófagos infectados constituem uma fonte potencial de infecção [4]. Soma-se a isto a adaptação dos LVPR para o hospedeiro, demonstrando que a transmissão e disseminação desses vírus são mais complexas que a simples ideia da especificidade à espécie [10,16].

A intermitência nas detecções do DNA proviral do CAEV no presente trabalho, é corroborada com resultados semelhantes observados em outros fluidos corporais como em sangue e sêmen [14]. Na saliva de humanos, quando amostras individuais foram testadas, apenas 50% dos pacientes eram positivos para sequências de HIV-1. No entanto, quando várias amostras de um mesmo indivíduo foram testadas, 100% dos pacientes apresentaram resultados positivos [9]. De modo similar, no presente trabalho somente chegou-se a 100% de positividade do CAEV na saliva dos animais, com maior frequência das coletas. Possivelmente, o número de células infectadas na saliva esteja em constante mudança, ou em número insuficiente para detecção, até mesmo que o provírus esteja ausente no fluido em determinados momentos. Resultando em variação na frequência de detecção nas amostras colhidas de um mesmo animal. Outros fatores como latência viral e replicação viral restrita nos animais infectados pelo LVPR podem, também, contribuir para explicar a intermitência dos resultados [20].

CONCLUSÃO

Neste trabalho, comprovou-se que caprinos infectados excretam o CAEV na saliva em sua forma proviral, e possivelmente as células deste fluido que o albergam podem produzir vírus infeccioso. Este achado tem impacto na epidemiologia da enfermidade e deve ser levado em consideração na implantação de programas de controle desta lentivirose.

Contudo, outros estudos ainda devem ser realizados para se determinar a participação desse agente na saliva, bem como a possibilidade de transmissão a partir de certas concentrações e quais as circunstâncias de maior vulnerabilidade dos animais.

MANUFACTURERS

¹GE Healthcare. Cambridgeshire. Cambridge, England.

²Eppendorf. Hamburg, German.

³Sigma Aldrich. St. Louis, MO, USA.

⁴Cambridgeshire. Cambridge, England.

⁵Invitrogen. Carlsbad, CA, USA.

⁶Cycle Sequencing. Foster City, CA, USA.

⁷Genetic Analyzer. Foster City, CA, USA.

Ethical Approval. This work is part of the PhD thesis of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) under number 01912.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Abrão M.G., Billerbeck A.E.C., Nishi M.Y., Marui S. & Mendonça B.B. 2005.** Padronização da Técnica de Extração de DNA de Células de Mucosa Oral Com NaCl: Aplicação no Estudo do Gene PROP1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 49(6): 978-982.
- 2 **Andrioli A., Gouveia A.M.G., Martins A.S., Pinheiro R.R. & Santos D.O. 2006.** Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41(8): 1313-1319.
- 3 **Barlough J., East N., Rowe J.D., Hoosier K.V., Derock E., Bigornia L. & Rimstad E. 1994.** 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*. 50(1-3): 101-114.
- 4 **Broughton-Neiswanger L.E., White S.N., Knowles D.P., Mousel M.R., Lewis G.S., Herndon D.R. & Herrmann-Hoesing L.M. 2010.** Non-maternal transmission is the major mode of ovine lentivírus transmission in a ewe flock: A molecular epidemiology study. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(7): 998-1007.
- 5 **Cattani P., Capuano M., Cerimele F., La Parola I.L., Santangelo R., Masini C., Cerimele D. & Fadda G. 1999.** Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human immunodeficiency virus-seronegative patients from central and southern Italy, with and without Kaposi's Sarcoma. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4): 1150-1153.
- 6 **J.C.M., Gouveia A.M.G., Souza K.C., Braz G.F., Teixeira B.M., Heinemann M.B., Leite R.C., Reis J.K.P., Pinheiro R.R. & Andrioli A. 2009.** Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminants Research*. 85(2-3): 149-152.
- 7 **Feitosa A.L.V.L., Gregori F., Brandao P.E., Pinheiro R.R. & Teixeira M.F.S. 2014.** Molecular characterization of Small Ruminant Lentiviruses isolated from Brazilian goats based on gag gene sequence analysis. Unpublished. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/409093671?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=1CE56WA501N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/409093671?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=1CE56WA501N). Acessado em: 09/2014.
- 8 **Feitosa A.L.V.L., Teixeira M.F.S., Pinheiro R.R., Da Cunha R.M.S., Lima J.P.M.S., Andrioli A., Dantas T.V.M., De Melo V.S.P. & Pinheiro D.C.S.N. 2010.** Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminants Research*. 94(1-3): 205-209.
- 9 **Goto Y., Yeh C., Notkins A.L. & Prabhakar B.S. 1991.** Detection of Proviral Sequences in Saliva of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 7(3): 343-347.
- 10 **Grego E., Bertolotti L., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D. & Rosati S. 2007.** Genetic characterization of small ruminant lentivirus in italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *Journal of General Virology*. 88(12): 3423-3427.
- 11 **Gudnadottir M. & Palsson P.A. 1965.** Host-virus interaction in Visna infected sheep. *The Journal of Immunology*. 95(6): 6111-6120.

- 12 McNeilly T.N., Baker A., Brown J.K., Collie D., Maclachlan G., Rhind S.M. & Harkiss G.D. 2008. Role of alveolar macrophages in respiratory transmission of Visna/Maedi virus. *Journal of Virology*. 82(3): 1526-1536.
- 13 Pasick J. 1998. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 62(4): 241-244.
- 14 Paula N.R.O., Andrioli A., Cardoso J.F.S., Pinheiro R.R., Sousa F.M.L., Souza K.C., Alves F.S.F., Campello C.C., Ricarte A.R.F. & Teixeira M.F.S. 2009. 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 Ruminants Research*. 85(1): 27-33.
- 15 Pinheiro R.R., Andrioli A., Gouveia A.M.G., Aragão M.A.C. & Martinez P.M. 2010. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77(1): 133-137.
- 16 Pisoni G., Bertoni G., Puricelli M., Maccalli M. & Moroni P. 2007. Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *Journal of Virology*. 81(10): 4948-4955.
- 17 Qureshi M.N., Barr'P C.E., Hewlitt I., Boorsteirr R., Kong F., Bagasra O., Bobroski L.E. & Joshi B. 1997. Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Disease*. 3(suppl. L): 73-78.
- 18 Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E. & Bertoni G. 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 350(1): 116-127.
- 19 Reischak D., Wendelstein A.C., Korndörfer C.N., Dezan C.P., Guglielmi V.O. & Moojen V. 2002. Importância da escolha dos reagentes para o diagnóstico de infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos. *Veterinária Notícias*. 8(2): 51-56.
- 20 Rimstad E., East N.E., Torten M., Higgins J., Derock E., & Pedersen N.C. 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *American Journal of Veterinary Research*. 54 (11): 1858-1862.
- 21 Saltarelli M., Querat G., Konings D.A., Vigne R. & Clements J.E. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*. 179(1): 347- 364.
- 22 Santry L.A., de Jong J., Gold A.C., Walsh S R., Menzies P.I. & Wootton S.K. 2013. Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in Ontario. *Canada Virus Research*. 175(1): 30-44.
- 23 Sousa T.S. 2014. Transmissão interespécies de lentivírus de caprinos para ovinos: aspectos clínicos e epidemiológicos, monitoramento sorológico e análise molecular. 127f. Salvador-BA. Tese (Doutorado em Ciências Animais nos Trópicos), Universidade Federal da Bahia.
- 24 Villoria M., Leginagoikoa I., Luján L., Pérez M., Salazar E., Berriatua E., Juste R.A. & Minguijón E. 2013. Detection of Small Ruminant Lentivirus in environmental samples of air and water. *Small Ruminants Research*. 110(2-3): 155-160.
- 25 Yamamoto J.K., Sparger E.W., Ho P.R., Andersen T.P., O'Connor C.P., Mandell L., Lowestine L. & Munn R. & Pedersen N.C. 1988. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *American Journal of Veterinary Research*. 49(8): 1246-1258.