

Comparação de testes sorológicos e molecular para diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina e avaliação clínica da glândula mamária de caprinos leiteiros infectados

Comparison of Serological and Molecular Tests for Diagnosis of Caprine Arthritis Encephalitis and Clinical Evaluation of Mammary Glands of Infected Dairy Goats

Dalva Alana Aragão de Azevedo¹, Raymundo Rizaldo Pinheiro², Vanderlan Warlington Souza dos Santos³, Edgar Marques Damasceno⁴, Ana Lídia Madeira de Sousa¹, Juscilânia Furtado Araújo⁵, Alice Andrioli², Lúcia Helena Sider², Renato Mesquita Peixoto⁶ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹

ABSTRACT

Background: Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) is a disease that causes productive losses in dairy goat flocks due to the reduction in milk production, followed by lesions in joints and mammary glands. An early diagnosis is essential, considering that there is frequent occurrence of asymptomatic animals. Hence, this study aimed to perform a comparison of immunological and molecular based diagnostic tests, represented by Agar Gel Immunodiffusion (AGID), Western Blot (WB) and nested Polymerase Chain Reaction (nPCR). In addition, the mammary glands (MG) of dairy goats were clinically evaluated. **Materials, Methods & Results:** Blood collection and clinical examination were performed in 1191 dairy goats of 12 farms located in Northeastern and Southeastern regions of Brazil. Serological (AGID, WB) and molecular (nPCR) test results were compared and the data, along with MG alterations, were analyzed using Epi-info 7 and WinEpiScope 2.0. Seroprevalence in AGID test was 41.14% (490/1191). In WB, 51.47% (613/1191) of animals were seropositive and nPCR detected 69.44% (827/1191) positive animals. Hence, WB was more sensitive ($P < 0.001$) than AGID. However, nPCR detected more positive animals than AGID ($P < 0.001$) and WB ($P < 0.001$). The analysis of mammary glands revealed that 105 out of 1096 nanny goats presented alterations, of which 101 presented altered consistency, 16 presented elevated temperatures and 60 had enlarged retromammary lymph nodes. There was significant statistic difference ($P < 0.05$) only when comparing the results of serological tests with MG alterations. **Discussion:** In general, AGID technique is most frequently used when screening flocks for the disease due to the practicality and low cost this test presents. However, the results demonstrated that AGID detected the lowest number of positive animals. This low sensitivity that the test presented may be attributed to its antigen-antibody interaction mechanism, considering that agar gel precipitation requires multiple interactions. In addition, WB was more effective than AGID in detecting antibodies. On the other hand, nPCR was important for the detection of infected animals that serological tests failed to detect. The intermittence of immunological response observed in the serological tests may be explained by the variation of antibodies levels that may occur during life. Likewise, viral compartmentalization would justify the intermittent detection of proviral DNA. Hence, the results can be influenced by the viral intermittence, test sensitivity, late seroconversion and statistic values that can be calculated (sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive level and kappa). Crossing the results of the diagnostic tests with the different mammary gland alterations, it was shown that there was a statistically significant difference ($P < 0.05$) only in the comparison of the results of the serological tests with GM alterations. Everything indicates that the humoral or cellular immune system being on stimulus is more propitious to find these changes. In conclusion, WB was more sensitive than AGID and, considering that nPCR can detect a larger number of animals infected with the goat lentivirus, it must be associated with a sensible serological test, such as Western Blot. In addition, infected animals have alterations in MG, which is more frequent in cases with positive serological results.

Keywords: dairy goat, detection, clinical examination, goat lentivirus.

Descritores: caprinocultura leiteira, detecção, exame clínico, lentivírus caprino.

DOI: 10.22456/1679-9216.92281

Received: 27 February 2019

Accepted: 19 May 2019

Published: 25 June 2019

Article based on a Thesis submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree. ¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ²EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE. ³Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral. ⁵Rede de Biotecnologia do Nordeste (RENORBIO), UECE, Fortaleza. ⁶Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental (PPGESPA), Universidade Federal do Acre (UFAC), Rio Branco, AC, Brazil. CORRESPONDENCE: D.A.A. AZEVEDO [dalvaazevedo@outlook.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba n. 1700. Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.

INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) ocasiona perdas econômicas, em geral, relacionadas a sinais clínicos e redução da produção leiteira dos animais [17]. Dentre as formas clínicas dessa enfermidade a mamária tem maior relevância por ocasionar danos na produção leiteira, e predispor infecções secundárias na mama. Dessa forma, torna-se de grande valia a detecção precoce da enfermidade devido a inexistência de uma vacina e/ou tratamento eficaz contra o lentivírus caprino, e ocorrência de animais infectados, porém assintomáticos [19].

Assim, técnicas como a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), juntamente como a imunoadsorção enzimática (ELISA) indireto são os testes recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) [20]. Mas, em virtude da alta especificidade e sensibilidade o Western Blot (WB) tem-se destacado na detecção de anticorpos contra o lentivírus [22,32]. Enquanto isso, na detecção direta opta-se pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, a qual se baseia na amplificação *in vitro* de uma sequência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA). Portanto, objetivou-se comparar os testes de diagnóstico imunológicos e molecular baseados no IDGA, WB e nPCR, bem como avaliar clinicamente a glândula mamária (GM) de matrizes de rebanhos leiteiros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

A pesquisa foi realizada em 12 propriedades com representatividade na produção de leite caprino em estados de duas regiões do Brasil, as quais representam cerca de 94,54% do rebanho caprino brasileiro [15].

Animais

Utilizou-se um total de 1096 fêmeas, 12 machos jovens e 83 reprodutores, totalizando 1191 animais de raça de aptidão leiteira submetidos a sistema intensivo de produção, e com idade a partir de 12 meses

Procedimento experimental

Para os testes de diagnóstico utilizou-se o plasma sanguíneo e os leucócitos obtido pela coleta de sangue por venipuntura da jugular de todos os animais, por sistema à vácuo, com dois tubos¹ de 10 mL com anticoagulante. Durante as coletas de sangue também realizou-se exame clínico da glândula mamária nas fêmeas através da inspeção e palpação, a fim de verificar

alterações na consistência, na temperatura e alteração do linfonodo retromamário. Após a coleta, os tubos foram centrifugados em centrífuga (Excelsa® II 206 BL)² não refrigerada a 1.500 g por 15 min, com o plasma e a camada de leucócitos transferidos separadamente para microtubos³, sendo a camada de leucócitos colocada juntamente com 600 µL de cloreto de amônia⁴, após todos os microtubos eram acondicionados em gelo em embalagem isotérmica (isopor), e encaminhados a Embrapa Caprinos e Ovinos em Sobral, Ceará, onde foram estocados a -20°C.

Na detecção de anticorpos contra o vírus da CAE no plasma sanguíneo utilizou-se a microtécnica de imunodifusão em gel de ágar (MIDGA) [12], e a técnica de Western Blot (WB) [32]. O antígeno para o IDGA foi produzido experimentalmente pelo Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos segundo metodologia de Pinheiro *et al.* [25] com cepa padrão CAEV-Cork (Amostra viral gentilmente cedida pela UFRPE)⁵. No preparo do antígeno utilizado no WB utilizou-se o método de ultracentrifugação em gradiente de sacarose⁴ [11].

A extração de DNA ocorreu a partir dos leucócitos conforme Grimberg *et al.* [13]. Posteriormente as amostras de DNA foram submetidas à nPCR [2]. Duas etapas de PCR foram realizadas a fim de amplificar um fragmento, do gene gag de 185 bp de DNA pró-viral do lentivírus. Todos os iniciadores foram determinados a partir da região do gene estrutural gag da amostra padrão CAEV-Cork [33] (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler ep Gradient 5341)³ com um volume final de 50 µL, contendo tampão Tris-HCl (pH:8,3)⁴ - 10 mM; KCl - 50 mM⁴; MgCl² - 1,5 mM⁴; 100 µM de cada dNTP⁴; 20 pmol de cada iniciador 2UI de Taq DNA polimerase⁴. Na primeira rodada 3 µL de DNA da amostra foi adicionado e na segunda rodada 1 µL do produto amplificado da primeira rodada. Foi utilizado um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo obtido a partir de células de membrana sinovial caprina (MSC) infectadas com cepa CAEV-Cork.

As etapas foram constituídas por uma desnaturação inicial 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos: desnaturação 94°C por 1 min., anelamento 56°C por 1 min, extensão 72°C por 45 s, seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 min. Por conseguinte os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose⁴ a

2%, corado com brometo de etídio⁴ e visualizado em transiluminador ultravioleta (Benchtop™ UV)⁶ e foto documentadas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram comparados ao padrão de peso molecular 100pb DNA ladder (TrackIt™)⁷ e ao controle positivo.

Análise estatística

Realizou-se um estudo comparativo dos resultados obtidos nos testes de IDGA, WB e PCR. Foram avaliados sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, e eficiência (habilidade do um teste identificar corretamente todos os indivíduos positivos e negativos). Os resultados dos testes foram comparados através do teste de Qui-quadrado com correção de Yates (χ^2) [37]. Calculou-se, também, o índice Kappa entre os resultados dos testes. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando os programas Epi-info 7.0⁸ e WinEpiscope 2.0⁹. As alterações na glândula mamária foram confrontadas com os resultados dos três testes de diagnóstico e comparadas através do teste de Qui-quadrado com correção de Yates (χ^2).

RESULTADOS

Analisando os dados desse estudo (Figura 1) observou-se que 41,14% (490/1191) dos animais foram soropositivos para a CAE pela IDGA, e no WB esse percentual elevou-se para 51,47% (613/1191). Enquanto isso no nPCR em 69,44% (827/1191) dos animais experimentais foi detectado DNA pró-viral. Vale ressaltar que todos os animais positivos na IDGA, foram positivos no WB, o qual detectou ainda 123 amostras positivas que a IDGA não conseguiu detectar, e portanto o WB foi mais sensível ($P < 0,001$) que a IDGA.

Quanto ao nPCR, este detectou uma maior quantidade de animais com a doença quando comparado com a IDGA ($P < 0,001$) e o WB ($P < 0,001$), sendo que das 827 amostras positivas para este, 52,36% (433/827) e 41,60% (344/827) foram negativas na IDGA e WB, respectivamente. Neste estudo aliando o resultado de animais positivos no WB e/ou no nPCR verificou uma positividade de 80,35% (957/1191), índice este bem superior ($P < 0,001$) ao encontrado no caso dos testes realizados isoladamente (WB: 51,47%; nPCR: 69,44%).

Na Tabela 2 observa-se que o WB em relação ao IDGA apresentou índice Kappa de 0,795 valor que demonstra a concordância dos resultados de WB. Considerando a relação entre nPCR com IDGA e WB os valores de Kappa 0,169 e 0,195, respectivamente,

foram baixos pois considerou-se a relação entre os testes sorológicos e molecular, métodos os quais utilizam meios diferentes para a detectar a infecção. Além disso pode existir a possibilidade, ainda que remota, do nPCR apresentar falso positivo. Os números de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), concordância (Conc), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) foram satisfatórios.

Com relação à análise da glândula mamária, das 1096 fêmeas, 101 obtiveram alterações na consistência, 16 tinham aumento na temperatura da glândula e 60 animais tiveram aumento do linfonodo retromamário. Cruzando os resultados dos testes de diagnóstico com as diferentes alterações na glândula mamária (Tabelas 3 e 4) demonstrou-se que houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) apenas na comparação dos resultados dos testes sorológicos com as alterações da GM. Neste estudo animais com resultado positivo para CAE apresentaram mais alterações na GM do que animais negativos ($P < 0,05$). Não foi observada diferença estatística significativa quando comparado os resultados de nPCR com as alterações na GM. Já os resultados sorológicos foram estatisticamente significativos demonstrando que é mais provável encontrar alterações na GM em animais com resultado sorológico positivo.

DISCUSSÃO

No presente estudo a IDGA entre os testes utilizados foi o que detectou um menor número de animais positivos, podendo-se atribuir essa ocorrência a baixa sensibilidade do mesmo, a qual já foi evidenciada em outras pesquisas [1, 22]. Segundo Pinheiro et al. [26] ao analisarem a sensibilidade dos testes de diagnóstico IDGA, ELISA e WB constataram que o WB tem a capacidade de detectar anticorpos em uma diluição de até 128 vezes maior que o IDGA e 16 vezes maior que o ELISA, o que justifica a diferença entre o nível de detecção de anticorpos entre esses testes. A menor sensibilidade da IDGA pode ser explicada em parte pelo mecanismo de interação antígeno-anticorpo. Embora os testes imunoenzimáticos requeiram a ligação de somente um simples epitopo para obter um resultado positivo, a precipitação em gel de ágar requer interações múltiplas antígeno-anticorpo [10].

Diferentemente dos testes sorológicos a PCR detecta diretamente o vírus pela amplificação de uma parte do DNA pró-viral, assim um teste molecular

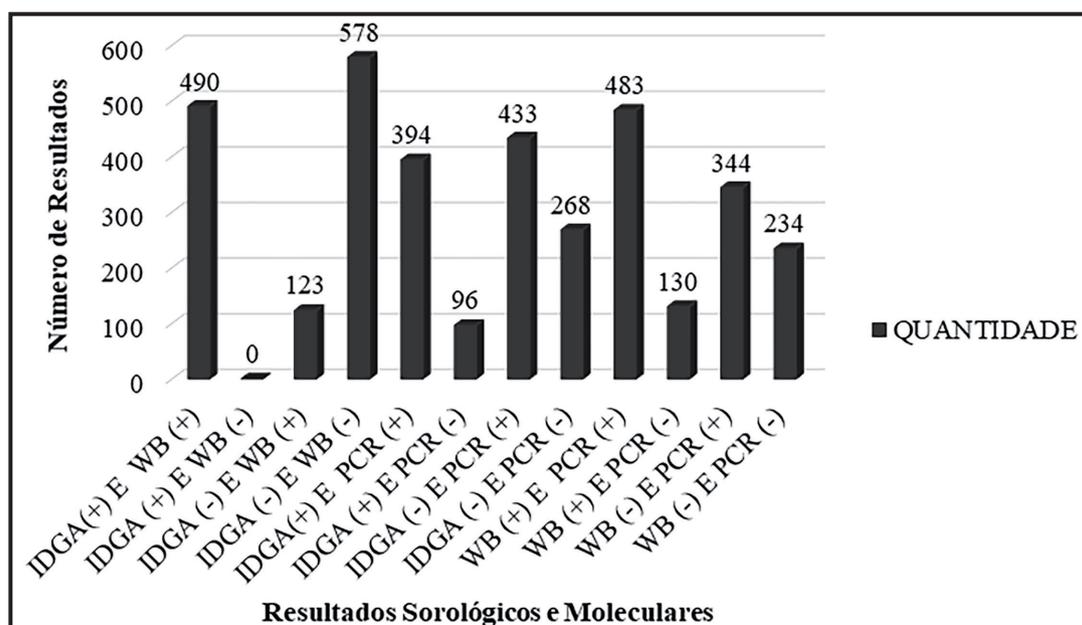


Figura 1. Associação dos resultados do diagnóstico sorológico entre Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) com Western Blot (WB) e de ambos com a Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR) para o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) em rebanhos de caprinos leiteiros em propriedades da região nordeste e sudeste do Brasil.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores usados na Reação em Cadeia da Polimerase Nested. (nPCR) com o tamanho dos fragmentos amplificados.

Gene <i>Gag</i>	Primers	Sequências 5' → 3'	Fragmentos (pb)
1º round	<i>Gag</i> 1	CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG	297
	<i>Gag</i> 2	TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC	
2º round	<i>Gag</i> 3	GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG	185
	<i>Gag</i> 4	ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC	

Tabela 2. Valores estimados de sensibilidade (Sens), especificidade (Espec), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), concordância (Conc), índice Kappa e Qui-quadrado (χ^2) para Western Blot (WB) e Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR) em relação à Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) no diagnóstico da Artrite Encefalite Caprina.

Teste	Sens (%)	Espec (%)	VPP	VPN	Conc	Kappa	χ^2 *
WB	100	79,90	82,40	100	89,70	0,795	781,67 ($P < 0,001$)
nPCR	80,40	38,20	47,60	73,60	55,60	0,169	43,34 ($P < 0,001$)

*Qui-quadrado com correção de Yates.

como a nPCR é relevante na identificação de animais infectados e não detectados em testes sorológicos, o que pode ocorrer no caso de soroconversão tardia ou na fase inicial da infecção, situações nas quais essa técnica apresenta maior sensibilidade [34,36].

Adicionalmente, a intermitência da resposta imunológica observada no presente estudo, possivelmente, deve-se ao fato que animais sabidamente positivos apresentarem níveis variáveis de anticorpos ao longo de semanas, meses e até anos [28]. Além disso, a ausência de soroconversão ou soroconversão tardia de um animal

infectado com o lentivírus caprino pode estar relacionada com a patogenicidade da doença, que envolve a restrição da replicação e a latência viral na forma de DNA pró-viral integrado ao genoma celular de monócitos ou em suas células progenitoras na medula óssea [6]. Com isso, o vírus conservar-se oculto [6] e a infecção persiste sem a ativação do sistema imunológico [30].

A intermitência da presença do DNA pró-viral tanto no sangue como no sêmen também já foi observada por outros estudos [3,23]. Outra forte justificativa para a intermitência dos resultados positivos no teste de

Tabela 3. Comparação dos resultados dos testes de Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR), Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e Western Blot (WB) para a Artrite Encefalite Caprina com as alterações clínicas na consistência da glândula mamária.

Teste		Alterações consistência		
		SIM	NÃO	Total
IDGA	+	57	410	467
	-	44	585	629
	Total	101	995	1096
		$\chi^2 = 8,0853$		$P < 0,01$
WB	+	65	519	584
	-	36	476	512
	Total	101	995	1096
		$\chi^2 = 4,9998$		$P < 0,05$
PCR	+	78	687	765
	-	23	308	331
	Total	101	995	1096
		$\chi^2 = 2,5371$		$P \geq 0,05$

Tabela 4. Comparação dos resultados dos testes de Reação em Cadeia da Polimerase Nested (nPCR), Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e Western Blot (WB) para a Artrite Encefalite Caprina com as alterações clínicas de temperatura e linfonodo retromamário da glândula mamária.

Teste		Aumento Temperatura					Alteração Linfonodo Retromamário		
		SIM	NÃO	Total			SIM	NÃO	Total
IDGA	+	11	456	467	IDGA	+	37	430	467
	-	5	624	629		-	23	606	629
	Total	16	1080	1096		Total	60	1036	1096
Exato de Fisher		$P < 0,05$			Exato de Fisher		$\chi^2 = 8,6206$		
WB	+	11	573	584	WB	+	42	542	584
	-	5	507	512		-	18	494	512
	Total	16	1080	1096		Total	60	1036	1096
Exato de Fisher		$P \geq 0,05$			Exato de Fisher		$\chi^2 = 6,4321$		
PCR	+	12	753	765	PCR	+	43	722	765
	-	4	327	331		-	17	314	331
	Total	16	1080	1096		Total	60	1036	1096
Exato de Fisher		$P \geq 0,05$			Exato de Fisher		$\chi^2 = 0,0322$		

nPCR pode estar relacionada à compartimentalização viral do lentivírus caprino. A compartimentalização de *quasispecies* de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) é determinada como a distinção genética de isolados de LVPR em diferentes tecidos animais, correspondendo a subpopulações virais no mesmo indivíduo [29]. Dessa forma, o vírus permanece em um órgão ou órgãos específicos e não na corrente sanguínea, caso este demonstrado em outros trabalhos [9,14]. Entretanto, mesmo devido a variabilidade genética dos

LVPR a nPCR identificou muitos animais positivos. Provavelmente isso se deve aos *primers* desenhados pela cepa padrão Cork pertencente ao genótipo B, subtipo B1, o qual foi identificado com caracterização molecular de cepas isoladas no Brasil. A análise filogenética de 32 isolados brasileiros de LVPR de vários estados evidenciou, que a principal presença no país foi o genótipo B, subtipo B1 [7].

Vale ressaltar que sobre as variáveis relacionadas à validade dos testes sorológicos observou-se que

os valores relatados nessa pesquisa foram similares a outros estudos [18,24]. Ademais, com base nos resultados apresentados o mais indicado seria a combinação de um teste molecular e um sorológico para diagnosticar a CAE, no caso desse estudo o nPCR e WB, como indicado anteriormente em outras avaliações [21,31], mas podem ser influenciados pela intermitência viral, nível de sensibilidade dos testes, soroconversão tardia, bem como pelos valores estatísticos usados na avaliação.

Sabe-se que as lesões causadas pelos lentivírus caracterizam-se pela migração/infiltração de células mononucleares e linfócitos para o tecido [8]. Assim, as lesões são mais frequentes quando o sistema imune, humoral e celular, tenha sido estimulado, fato esse indicado no presente estudo uma vez que os animais soropositivos para CAE foram os que mais tiveram alterações na glândula mamária, fato que corrobora com outras pesquisas [5,38]. A replicação viral periódica e a maturação dos macrófagos induzem as lesões linfoproliferativas características nos tecidos-alvo, como o úbere. Nas glândulas mamárias o CAEV induz a inflamação crônica invocando as respostas imunes do hospedeiro. A doença resulta desta inflamação provocada pela reação do sistema imunológico ao vírus [27]. Portanto isso explica que porque animais infectados e sorologicamente positivos possuem mais alterações na GM, que aqueles com a presença do DNA viral.

Foi demonstrado por Tariba *et al.* [35] uma relação positiva entre soropositividade para CAE via IDGA e problema de mastite subclínica ao se avaliar 543 cabras da raça Alpina. Utilizando o mesmo teste Lara *et al.* [16] verificaram uma ocorrência maior do endurecimento da glândula mamária nas cabras com infecção pelo lentivírus caprino (6,8%) do que nas não sororreagentes (1,2%). Alterações na GM também foram identificadas em ovelhas diagnosticadas, por ELISA, com Maedi-Visna tais como infiltração moderada ou grave de linfócitos, macrófagos e células plas-

máticas no parênquima glandular, além de hiperplasia periductal dos folículos linfóides [4]. Esses danos na GM podem prejudicar a produção leiteira a qual é menor em cabras soropositivas e tende a diminuir de acordo com a idade do animal [17].

CONCLUSÃO

Dentre os testes sorológicos utilizados o WB foi mais sensível que a IDGA, e a nPCR detectou uma maior quantidade de animais infectados com lentivírus caprino. Assim, para diagnosticar a CAE o ideal é associar um teste sorológico com um molecular. Adicionalmente, animais infectados tendem a possuir alterações na GM, sendo mais provável encontrar essas alterações em animais com resultado sorológico positivo.

MANUFACTURERS

¹BD Vacutainer®. São Paulo, SP, Brazil.

²FANEM® Ltda. Guarulhos, SP, Brazil.

³Eppendorf. Hamburg, Germany.

⁴Sigma-Aldrich Corporation. St. Louis, MO, USA.

⁵Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants, INRA, ENVL, Lyon, France.

⁶Cambridgeshire. Cambridge, England.

⁷Invitrogen. Carlsbad, CA, USA.

⁸Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Atlanta, GA, USA.

⁹MS-DOS Software. Wageningen, Netherlands.

Funding. The work was financially supported by Funcap [Project number BP2-0107-00240.01.00/15], CNPq/MAPA/SDA [Project number 578438/2008-9], and EMBRAPA [Project number 02.13.10.003.00.05].

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 013/2015. In each farm where the collections took place a confidentiality term was applied which keeps the farms and region to which they belong.

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 **Alves S.M., Teixeira M.F.S., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Lima A.M.C., Farias D.A., Santos V.W.S., Azevedo D.A.A., Martins G.R. & Aguiar T.D.F. 2018.** Seroepidemiological study of maedi-visna in sheep in Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, and Sergipe States. *Semina: Ciências Agrárias*. 39(5): 2017-2028.
- 2 **Andrioli A. 2001.** Vírus da Artrite Encefalite Caprina: PCR e isolamento viral de amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. 68f. Belo Horizonte, MG. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 3 **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: 1313-1319.

- 4 Benavides J., Fuertes M., García-Pariente C., Otaola J., Delgado L., Giraldez J., Marín J.F.G., Ferreras M. C. & Pérez V. 2013. Impact of maedi visna in intensively managed dairy sheep. *The Veterinary Journal*. 197: 607-612.
- 5 Bertoni G., Zahno M.L., Zanoni, R., Vogt H.R., Peterhans E., Ruff G., Cheevers W.P., Sonigo P. & Pancino G. 1994. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with development of arthritis. *Journal of Virology*. 68(11): 7139-7147.
- 6 Blacklaws B.A. 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 35(3): 259-269.
- 7 Braz G.F. 2013. Lentivirus de pequenos ruminantes: caracterização genética e antigênica de isolados de caprinos e ovinos do Brasil. 79f. Belo Horizonte, MG. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.
- 8 Brodie S.J., De La Concha-Bermejillo A., Snowden G.D. & Demartini J.C. 1998. Current concepts in the epizootiology, diagnosis and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: A review. *Small Ruminant Research*. 27(1): 1-17.
- 9 Cavalcante R.F.R.A., Andrioli A., Pinheiro R.R., Sousa K.C., Veras A.K.A., Lopes T.A. & Sousa S.D. 2013. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por nested PCR e nested RT-PCR em ovócitos e fluido uterino. *Arquivos do Instituto Biológico*. 80: 381-386.
- 10 Celer Junior V., Celer V., Némcová H., Zanoni R.G. & Peterhans E. 1998. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 45(3): 183-188.
- 11 Dantas T.V.M., Araújo S.A.C., Pinheiro R.R., Aragão M.A.C., Silva J.B.A., Ricarte A.R.F., Ribeiro A.L. & Teixeira M.F.S. 2008. Desenvolvimento e padronização de um ELISA indireto para diagnóstico de Maedi Visna em ovinos. *Ciência Animal Brasileira*. 9(1): 181-187.
- 12 Gouveia A.M. 1994. Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus da pneumonia progressiva ovina (OPP), maedi-visna (MVV) e artrite encefalite caprina (CAEV). Sobral (Mimeografado). 4p.
- 13 Grimberg J., Nawoschik S., Belluscio L., Mckee R., Turck A. & Eisenberg A. 1989. A simple and eficiente non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Research*. 17: 8390.
- 14 Hasegawa Y.M., Lara M.C.C.S.H., Gaeta N.C., Marques J.A., Ribeiro B.L.M., Rossi R.S. & Gregory L. 2017. Transmissibilidade de Lentivírus de Pequenos Ruminantes para cabritos e cabras adultas por meio de sêmen infectado experimentalmente. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 37: 805-812.
- 15 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2014. Disponível em: <www.ibge.br/sidra>. [Accessed online in September 2018].
- 16 Lara M.C.C.S.H., Birgel Junior E.H., Gregory L. & Birgel E.H. 2005. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57(6): 736-740.
- 17 Martínez-Navalón B., Peris C., Gómes E.A., Peris B., Roche M.L., Caballero C., Govená E. & Berriatua E. 2013. Quantitative estimation of the impact of caprine arthritis encephalitis virus infection on milk production by dairy goats. *Veterinary Journal*. 197(2): 311-317.
- 18 Michiels R., Mael E.V., Quinet C., Adjadj N.R., Cay A.B. & De Regge N. 2018. Comparative Analysis of Different Serological and Molecular Tests for the Detection of Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) in Belgian Sheep and Goats. *Viruses*. 10: 696.
- 19 Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J.J., García-Marín J.F., Andrés D., Luján L., Amorena B. & Juste R.A. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*. 181(1-2): 75-89.
- 20 Office International des Epizooties - OIE. 2004. *Manual of standards diagnostic tests and vaccines*. World Organization for Animal Health. 5th edn. Paris: OIE, 1178p.
- 21 Panneum S. & Rukkwamsuk T. 2017. Diagnosis of Caprine Arthritis Encephalitis Virus infection in dairy goats by ELISA, PCR and Viral Culture. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 20(2): 347-353.
- 22 Peixoto R.M., Andrioli A., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Santos V.W.S., Sousa M.M., Azevedo D.A.A., Damasceno E.M. & Teixeira M.F.S. 2018. *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46: 1533.

- 23 **Peterson K., Brinkhof J., Houwers D.J., Colenbrander B. & Gadella B.M. 2008.** Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*. 69: 433-442.
- 24 **Pinheiro R.R., Olortegui C.D.C., Gouveia A.M.G., Araújo S.C. & Andrioli A. 2006.** Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Carina em Caprinos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 101: 557-558.
- 25 **Pinheiro R.R., Andrioli A., Martinez P.M., 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.
- 26 **Pinheiro R.R., Andrioli A., Sider L.H., Santiago L.B., Oliveira E.L., Sousa A.L.M., Alves F.S.F. & Cruz J.C.M. 2012.** *Lentivirose em Pequenos Ruminantes: Principais Métodos de Diagnóstico* (Documentos 107). Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 42p.
- 27 **Plummer P.J. & Still K.M. 2012.** Diseases of the Respiratory System. In: Pugh D.N. & Baird A.N. (Eds). *Sheep and Goat Medicine*. 2nd edn. St. Louis: Saunders, 640p.
- 28 **Preziuso S., Sanna E., Sanna M.P., Loddo C., Cerri D., Taccini E., Mariotti F., Braca G., Rossi G. & Renzoni G. 2003.** Association of maedi visna virus with *Brucella ovis* infection in rams. *European Journal Histochemistry*. 47: 151-158.
- 29 **Ramírez H., Reina R., Bertolotti L., Cenoz A., Hernández M.M., San Román B. & De Andrés D. 2012.** Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Veterinary Research*. 8: 1-12.
- 30 **Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhan 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: 116-127.
- 31 **Reina R., Berriatua E., Lujhn L., Juste R., Shnchez A., de André's D. & Amorena B. 2009.** Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *The Veterinary Journal*. 182: 31-37.
- 32 **Rodrigues A.S., Brito R.L.L., Pinheiro R.R., Dias R.P., Alves S.M., Souza T.S., Souza K.C., Azevedo D.A.A., Andrioli A., Magalhães D.C.T. & Teixeira M.F.S. 2014.** Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2) 417-424.
- 33 **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.
- 34 **Souza K.C. 2010.** Artrite-encefalite caprina: Infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico. 100f. Sobral, CE. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú.
- 35 **Tariba B., Kostelić A., Šalamon D., Roić B., Benić M., Babić N.P. & Salajpal K. 2017.** Subclinical mastitis and clinical arthritis in French Alpine goats serologically positive for caprine arthritis-encephalitis virus. *Veterinarski Arhiv*. 87: 121-128.
- 36 **Tigre D.M., Campos G.S. & Sardi S.I. 2006.** 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*. 5: 124-131.
- 37 **Tyler J.W. & Cullor J.S. 1989.** Titers, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 194(11): 1550-1558.
- 38 **Valas S., Benoit C., Baudry C., Perrin G. & Mamoun R.Z. 2000.** Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Journal of Virology*. 74(13): 6178-6185.