

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA: INFECÇÃO EXPERIMENTAL VIA
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E
SOROLÓGICO**

KELMA COSTA DE SOUZA

**SOBRAL – CE
ABRIL – 2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA**

**ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA: INFECÇÃO EXPERIMENTAL VIA
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E
SOROLÓGICO**

KELMA COSTA DE SOUZA

**SOBRAL – CE
ABRIL – 2010**

KELMA COSTA DE SOUZA

ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA: INFECÇÃO EXPERIMENTAL VIA
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E
SOROLÓGICO

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Estadual Vale do Acaraú, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Reprodução de Ruminantes.

ORIENTADORA: DRA. ALICE ANDRIOLI PINHEIRO

SOBRAL – CE
ABRIL – 2010

**CIP - BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Ivete Costa de Oliveira**

S715a

Souza, Kelma Costa de

Artrite-encefalite caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico / Kelma Costa de Souza. -- Sobral: UVA/ Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, 2010. 99 f.

Orientador: Alice Andrioli Pinheiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas / Mestrado em Zootecnia, 2010.

1. Caprinos – artrite-encefalite. 2. Caprinos - enfermidades. 3. Enfermidades – transmissão sexual I. Pinheiro, Alice Pinheiro. II. Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas. IV. Embrapa. V. Título.

CDD 636.3089

Kelma Costa de Souza

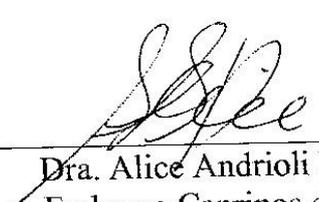
**ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA: INFECÇÃO EXPERIMENTAL VIA
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E
SOROLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Estadual Vale do Acaraú/ Embrapa Caprinos e Ovinos, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Reprodução de Ruminantes.

Orientadora: Dra. Alice Andrioli Pinheiro.

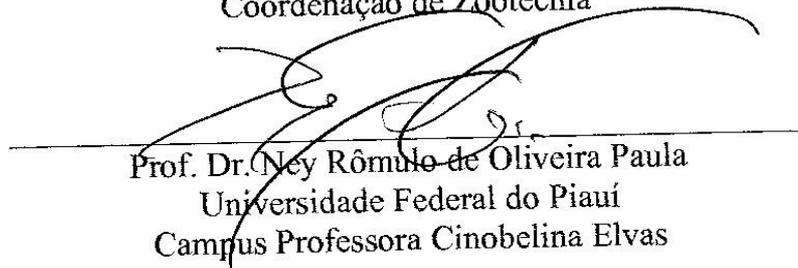
Dissertação defendida e aprovada em 22 / 04 / 2010 pela Comissão Examinadora constituída por:



Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Embrapa Caprinos e Ovinos
(Presidente)



Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Universidade Estadual Vale do Acaraú/
Embrapa Caprinos e Ovinos
Coordenação de Zootecnia



Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula
Universidade Federal do Piauí
Campus Professora Cinobelina Elvas



A minha família em especial minha mãe Ruth e minha irmã Keila, que sempre me apoiaram e me deram forças, creditando em mim confiança. A meu pai Leôncio, meu Irmão Kêno e sua esposa Ana Kécia e aos meus queridos sobrinhos Ana Beatriz e Leôncio Neto.

Ofereço

Mais uma vez a minha família, aos meus orientadores Dr.^a Alice Andrioli e Dr. Raymundo Rizaldo, aos demais funcionários e estagiários da Embrapa Caprinos e Ovinos, aos amigos e professores da Zootecnia e a todos que de alguma maneira ajudaram e acreditaram neste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

DEUS obrigada pela benção de chegar até aqui e por manter em mim um desejo cada vez maior de não parar, pois existe muito ainda o que aprender.

E como na vida é fundamental poder contar com o apoio e a ajuda de pessoas, e para a realização deste trabalho de dissertação, pude contar com várias. A essas pessoas prestarei através de poucas palavras, os meus sinceros agradecimentos.

À minha Família pelo carinho e compreensão.

À Dra. Alice Andrioli orientadora, que sempre creditou em mim confiança, repassando seus conhecimentos com carinho e paciência. Dra. tenha certeza de que lhe sou muito grata por todo o apoio em minha formação e que sempre terei um enorme carinho por você.

Ao Dr. e Professor Raymundo Rizaldo Pinheiro co-orientador e por ser a pessoa que proporcionou o meu primeiro estágio extra curricular na Embrapa.

Ao Dr. Diônes pela atenção e especialmente pela ajuda proporcionada no experimento.

À Dra. Hévila pela realização dos testes de diagnósticos.

À Dra. Ângela e ao Dr. Selmo pela participação na banca examinadora da pré-defesa, os quais contribuíram ricamente para o melhoramento da dissertação.

Ao Dr. Ney Rômulo e Dra. Lúcia Síder membros da banca examinadora.

A seu Pedro, seu Chiquinho e Orlando, que sempre cooperaram com as atividades de campo.

A toda turma da EMBRAPA: Osmarilda, Nobrega, João Ricardo, Dr. Luís, Dr. Cezar, D. Helena, Jamile, Jorge e Felipão pela amizade, por nossos muitos momentos de descontração. Não esquecendo dona Maria e seu Toinho.

À amiga Roberta Lomonte carinhosamente chamada por mim de cocó-orientadora, por toda sua contribuição, e a Leandro também agradeço.

À Apoliana pela ajuda nos testes de *Western Blot*.

Às meninas: Ismênia, Darly e Amanda que me foram muito úteis nas avaliações clínica dos animais.

A Rosalba, Daniele, Tatiana, Raquel amigas desde a graduação até o mestrado e Nadiana amiga mais recente, pelos momentos de alegria, companheirismo e pelas horas de estudo em equipe.

A todos os outros colegas do mestrado Lauana, Camila, Alixandre, Jorge Alberto, Leonardo e Vandenberg.

Aos demais amigos de estágio: Samile, Ana Kamila, Sueline, Maximiana, Milena, Dalva, Roberta do Valle, Ana Paula, Flávio, Diôgo, Ronaldo, Alan, Andrine, Vanderlan e muitos outros que passaram pela Embrapa e deixaram saudades.

Ao Juliano Minardi pelos conselhos e amizade.

Aos professores e funcionários do Mestrado da Universidade Estadual Vale do Acaraú/Embrapa Caprinos e Ovinos, pelos ensinamentos e orientações.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú, onde fui graduada e pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

A Embrapa Caprinos e Ovinos parceira do Curso de Mestrado, pelo apoio técnico e estrutural e especialmente porque foi através da empresa que ampliei meus conhecimentos e pude ingressar no meio científico.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro tanto do projeto, como em forma de bolsa.

Ao Banco do Nordeste e Governo do Estado do Ceará pelo suporte financeiro ao projeto.

E um agradecimento aos animais de maneira geral. Especialmente os incluídos nesta pesquisa.



A todos vocês meu muito obrigada.

“A esperança é um princípio vigoroso pois
leva o cérebro e o coração a trabalhar e
incentiva o homem a dar o Máximo de que é
capaz.”

Collier

SUMÁRIO

	PÁGINA
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
RESUMO GERAL	XIV
GENERAL ABSTRACT	XV
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	6
INTRODUÇÃO	7
1. Artrite-Encefalite Caprina	7
1. 1. Agente etiológico	8
1.1.1. Resposta imune ao CAEV.....	10
1. 2. Epidemiologia	11
1. 3. Sinais clínicos	12
1.4. Transmissão	14
1.4.1. Transmissão vertical do CAEV.....	14
1.4.2. Transmissão horizontal do CAEV.....	15
1.4.2.1. Transmissão horizontal indireta do CAEV.....	16
1.4.2.2 Transmissão horizontal direta do CAEV.....	16
1.5.	18
Diagnóstico	
1.5.1. Imunodifusão em gel de agarose	19
1.5.2. <i>Western Blot</i>	19
1.6. Controle e profilaxia	20
2. Sistema reprodutor dos caprinos	21
2.1. Sêmen e formas de contaminação	21
2.2. Imunologia do sistema reprodutor da fêmea	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO 2 – TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA ATRAVÉS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	36
RESUMO	37
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 3 – MONITORAMENTO SOROLÓGICO E CLÍNICO DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE PELO VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA.....	59
RESUMO	60

ABSTRACT	61
INTRODUÇÃO	62
MATERIAL E MÉTODOS	64
RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
PERSPECTIVAS	82

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
1. Tabela demonstrativa de alguns dos Estados brasileiros onde já foi diagnosticado o vírus da CAE	12
CAPÍTULO 2	
1. Porcentagem de fêmeas positivas nos dois protocolos Esponjas X Implantes com as diferentes cargas virais no período de 30 e 60 dias após as IAs com o sêmen contaminado	51
2. Taxas de gestação e parição, índice de prolificidade em cabras soronegativas e soropositivas para o CAEV	52
CAPÍTULO 3	
1. Resultados da reação de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) dos 30 aos 360 dias após as inseminações nos grupos experimentais.....	73
2. Resultados da reação do <i>Western Blot</i> dos 30 aos 360 dias das inseminações nos grupos experimentais	74

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
1. Estrutura do vírus da Artrite-Encefalite Caprina	9
2. Reprodutor caprino soropositivo para o CAEV com emagrecimento crônico	13
3. Articulação cárpica aumentada de fêmea soropositiva para o CAEV	13
4. Estrutura e forma do espermatozóide	22
CAPÍTULO 2	
1. Cerca dupla para separação dos piquetes dos animais experimentais	44
2. Resultado do <i>Western Blot</i>	48
CAPÍTULO 3	
1. Índice Articular Clínico, a) Mensuração do carpo b) Mensuração do metacarpo	65
2. Coleta de sangue por punção da veia jugular	66
3. a) Colocação do antígeno no orifício central da lâmina b) lâmina com os orifícios preenchidos pelas amostras, soro reagente e antígeno.....	67
4. Distribuição das amostras positivas pelos testes de IDGA e WB com 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após as IAs	70
5. Evolução da soroconversão das fêmeas nos 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após as IAs nos testes de IGDA e WB	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
χ^2	Qui-quadrado
°C	Graus Celsius
β	Beta
A	Ampères
Ac	Anticorpos
ACV	Alta Carga Viral
Ag	Antígeno
Anti-CAEV	Anticorpo anti-CAEV
AIDS	Sigla em inglês da Síndrome da imunodeficiência adquirida
EIAV	Sigla em inglês do Vírus da anemia Infecciosa Equina
BCV	Baixa Carga Viral
BIV	Sigla em inglês do Vírus da Imunodeficiência Bovina
bat/min	Batimentos por minuto
CAE	Sigla em inglês da Artrite-Encefalite Caprina
CAEV	Sigla em inglês do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina
cm	Centímetro
CN	Controle Negativo
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Sigla em inglês de Ácido desoxirribocucleico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ECG	Sigla em inglês de Gonadotrofina coriônica equina
ELISA	Ensaio de imunoadsorção enzimática
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da America
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
FIV	Sigla em inglês do Vírus da Imunodeficiência Felina
gp	Glicoproteína
HIV	Sigla em inglês do Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HIV1	Sigla em inglês da Imunodeficiência Adquirida do tipo 1
IA	Inseminação artificial
IAC	Índice articular clínico
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IDGA	Imunodifusão em Gel de Àgar
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LVPR	Lentivírus de Pequenos Ruminantes
m	Metro
MAP	Sigla em inglês de Acetato de medroxiprogesterona
MAPA	Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento
MEM	Meio essencial mínimo
mg	Miligrama
Mhz	Mega-hertz

mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
MN	Membrana de Nitrocelulose
mov/min	movimentos por minuto
MVV	Sigla em inglês do Vírus Maedi-Visna
OIE	Organização Internacional de Epizootias
PBS	Sigla em inglês da Solução de tampão fosfato-salina
PCR	Sigla em inglês da Reação em Cadeia da Polimerase
p	Proteína
PI	Pós-inoculação
P<0,05	Probabilidade menor que 5%
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Sigla em inglês do Ácido ribonucléico
SDS-PAGE	Sigla em inglês da Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SIV	Sigla em inglês do Vírus da imunodeficiência símia
SRD	Sem Raça Definida
TCID₅₀	Sigla em inglês da Dose infectante de 50% da cultura de tecido
TE	Transferência de embriões
UI	Unidades internacionais
V	Volts
WB	Western Blot
W	Watts
g	Unidade de força centrífuga relativa
ZP	Zona pelúcida

RESUMO GERAL

SOUZA, Kelma Costa de, MSc. Universidade Estadual Vale do Acaraú/ Embrapa Caprinos e Ovinos, Abril, 2010. **Artrite-Encefalite Caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico** Orientadora: Dr^a. Alice Andrioli Pinheiro. Conselheiro: Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

Desde os relatos dos primeiros casos da síndrome da Artrite-Encefalite Caprina (CAE) até o isolamento e identificação do vírus (CAEV) como o agente causador, os pesquisadores vêm buscando um maior conhecimento da doença, como a comprovação das formas de transmissão e os métodos laboratoriais capazes de auxiliar no diagnóstico e controle da infecção. Visando contribuir com estas questões, foram realizados dois experimentos na Embrapa Caprinos e Ovinos, sendo um para avaliar a transmissão do CAEV pelo sêmen via Inseminação Artificial (IA), e o outro para comparar os testes de diagnóstico, Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e *Western Blot* (WB), e correlacionar os resultados dos testes com os sinais clínicos da doença. Para tanto, 30 cabras Sem Raça Definida com idades entre um e três anos, sorologicamente negativas para o CAEV, tiveram o estro sincronizado utilizando-se dois protocolos: um grupo recebeu esponjas intravaginais e outro implantes subcutâneos auriculares. Para as inseminações foram divididas em três grupos de 10 animais e inseminadas com sêmen de um reprodutor Anglo-Nubiano (soronegativo), coletado por vagina artificial, dividido em três alíquotas e diluído em MEM com 2% de soro fetal bovino e glicose, sendo que em uma alíquota o meio de diluição portava o vírus cepa padrão CAEV-Cork, com título infectante 10^6 TCID₅₀/mL e em outra o título de 10^2 TCID₅₀/mL. A terceira alíquota foi diluída no mesmo meio sem o vírus para controle negativo. Aos 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após as inseminações as fêmeas foram monitoradas clinicamente e pelos testes de diagnósticos IDGA e WB. A transmissão foi confirmada aos 30 dias após as IAs em duas cabras por IDGA e em doze por WB. Aos 60 dias, todas as fêmeas (20) que receberam o sêmen contaminado apresentaram anticorpos anti CAEV através do teste de WB. As cabras do grupo controle permaneceram soronegativas durante todo o período experimental segundo os dois testes de diagnóstico. Todos os animais infectados mantiveram-se clinicamente saudáveis e sem nenhum sintoma característico da CAE durante 12 meses de infecção. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o vírus foi transmitido pela inseminação artificial com sêmen contaminado. Além disso, os animais inseminados com sêmen contaminado representam importantes fontes de infecção do CAEV, agravado pelo fato da doença não manifestar sintomas clínicos por um longo período de tempo e que o IDGA, que é o teste usualmente utilizado e recomendado pela OIE e pelo MAPA, não detecta os animais no início da infecção e apresenta elevada ocorrência de animais falso-negativos.

Palavras-chave: IDGA, lentivírus, sêmen, transmissão sexual, *Westen Blot*

GENERAL ABSTRACT

SOUZA, Kelma Costa de, MSc. Estadual University Vale of the Acaraú/ Embrapa goats and sheep Abril, 2010. **Caprine Arthritis-Encephalitis: experimental infection by the artificial insemination and clinical and serological monitoring.** Adviser: Dr^a. Alice Andrioli Pinheiro. Committee Member: Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

Since the reports of the first cases of the Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) syndrome to the isolation of the virus (CAEV) as the causative agent identification, the researchers are seeking rapid knowledge of CAE, evidence of transmission and laboratory methods that are able to assist in the diagnosis of infection. To complement these issues, two experiments were conducted at Embrapa Goats and Sheep in the period of October 2008 to October 2009. An experiment aimed to evaluate the transmission of CAEV via artificial insemination, and the other to identify which diagnostic test, immunodiffusion in agarose gel (AGID) or Western Blot (WB), would be able to detect seroconversion earlier, and their correlation with clinical signs of disease. Therefore, 30 undefined breed goats, serologically negative for CAEV. Were estrus synchronized using two protocols, one group received intravaginal sponges and other subcutaneous ear implants. For the inseminations were divided into three groups of 10 animals and inseminated with semen from an Anglo-Nubian (seronegative), collected by artificial vagina, divided into three aliquots and diluted in MEM with 2% fetal calf serum and glucose, and in a medium dilution rate was carrying the virus standard strain CAEV-Cork, with infective titles of 10^6 TCID₅₀/mL and another 10^2 TCID₅₀/mL. The third aliquot was diluted in the same medium without virus for negative control. The transmission was confirmed 30 days after the IAs in two goats by AGID and twelve by WB, 60 days in all females (20) who received the contaminated semen, had CAEV antibody test through the WB. At 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 days after insemination females were accompanied by diagnostic tests AGID and WB, and clinically. The transmission was confirmed 30 days in two goats by AGID and twelve by WB. Twelve months after the insemination, all females who received the negative control expressed anti-CAEV antibodies throughout the experimental period. All the infected animals remained clinically healthy and without any symptoms of CAE. Based on these results, we can conclude that the virus was transmitted by artificial insemination with contaminated semen. Moreover, the animals inseminated with semen contaminated represent important sources of CAEV infection, aggravated by the fact that the disease did not manifest clinical symptoms over a long period of time and that the AGID, which is the test commonly used and recommended by the OIE and the MAP not detect the animals at the onset of infection and has a high occurrence of false-negative animals .

Key words: AGID, CAE, goats, semen, sexual transmission, Western Blot

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

No Brasil a partir de 1978, importações de caprinos procedentes de vários países da Europa (França, Suíça, Alemanha, Holanda e Inglaterra) e da América do Norte (Estados Unidos e Canadá) foram feitas com o objetivo de introduzir material genético novo visando melhorar a produção de leite nos rebanhos nacionais. Nessas importações, realizadas sem adequada supervisão, foi também constatada a introdução da Artrite-Encefalite Caprina (CAE) (MOOJEN, 1986).

Atualmente a CAE está disseminada em quase todo território nacional. As dificuldades de realização e/ou a baixa sensibilidade dos testes de diagnóstico, aliada às incertezas sobre as vias de transmissão do vírus tem limitado os programas de controle da doença. A CAE é uma enfermidade crônica, incurável e com repercussão negativa sobre a produtividade do rebanho (BRITO, 2009). É causada por um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* e acomete caprinos de todas as raças, idades e sexos (CORK et al., 1974). Além do vírus da CAE (CAEV) pertencem a este mesmo gênero outros vírus de importância em patologia veterinária e humana, como o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), o Maedi-Visna (MVV) dos ovinos, e os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV) (ZANONI, 1993; PATRICK et al., 2002; QUINN et al., 2005).

A infecção se caracteriza por causar artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (CORK et al., 1974). Geralmente persistente e assintomática, a CAE pode causar infecção multissistêmica, de evolução geralmente crônica, com agravamento progressivo de lesões levando a perda de peso e debilidade até a morte (CALLADO et al., 2001). Após sua introdução num rebanho, a prevalência de animais soropositivos e clinicamente afetados é bastante variada, dependendo de fatores relacionados à intensidade do estresse, tipo de nutrição e condições gerais de higiene (CRAWFORD; ADAMS, 1981). As perdas econômicas são inevitáveis, acometendo diretamente os animais com a diminuição da vida produtiva, redução na produção leiteira e do período de lactação, como também a diminuição da eficiência reprodutiva (GREENWOOD, 1995; BIRGEL

JUNIOR et al., 2007; BRITO, 2009), e perdas indiretas como a desvalorização do rebanho e de seus produtos.

Quando reprodutores e matrizes são afetados, os programas de melhoramento genético são dificultados, e perdas econômicas são acarretadas aos caprinocultores, pois estes animais são afastados da reprodução (ANDRIOLI et al., 2003).

A disseminação da CAE pode ocorrer rapidamente num rebanho, sendo as principais vias de transmissão a ingestão de colostro e leite de cabras infectadas e o contato direto e prolongado entre os animais (ROWE et al., 1992). No entanto, outras vias de transmissão são cogitadas, como a materno-fetal e a reprodutiva (ANDRIOLI-PINHEIRO, 2001).

A detecção do vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) no sêmen de machos, infectados demonstra que talvez seja possível a transmissão da enfermidade por via sexual (ANDRIOLI et al., 1999, 2003; TRAVASSOS et al., 1999; PAULA et al., 2009), principalmente pela Inseminação Artificial (IA), onde várias fêmeas são inseminadas com um único ejaculado, havendo a possibilidade de introdução do vírus no rebanho e, como no caso da CAE, o aparecimento dos sintomas pode ser tardio, o vírus poderá se disseminar antes de ser diagnosticado (ANDRIOLI et al., 2003).

Em estudos com outros lentivírus, como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), já foi evidenciado a transmissão do vírus de um homem infectado para seus (suas) parceiros(as) sexuais pelo contato com sêmen infectado (ROYCE et al., 1997). O sêmen infectado contém tanto HIV-1 livre quanto intra-celular (LEVY, 1993; VERNAZZA, et al., 1994; WOLFF et al., 1995; GUPTA et al., 1997). E diversos estudos identificaram partículas virais, atividade da transcriptase reversa e células infectadas como carreadores potenciais do HIV durante a transmissão sexual (HO et al., 1984; ZAGURY et al., 1984; BORZY et al., 1988; LEVY, 1988.). Entretanto, a transmissão depende do estágio da doença, do estado imunológico ou nutricional do paciente e da associação com outras enfermidades (ALEXANDER, 1990).

Em caprinos, pouco se conhece sobre os fatores que interferem na presença dos lentivirus no sêmen (NASH et al., 1995; QUAYLE et al., 1997), sendo uma necessidade atual o incremento dessa linha de pesquisa para um melhor entendimento e controle do avanço de enfermidades víricas (ANDRIOLI et al., 2003). Desta forma, sabendo desta necessidade, o presente estudo teve como objetivo estudar a transmissão do CAEV em cabras via inseminação artificial, utilizando sêmen contaminado com duas cargas virais

distintas, e dois protocolos de sincronização estro. As fêmeas infectadas por esta via também foram acompanhadas sorológica e clinicamente por um período de um ano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

us entry into the male and female genital tract. **Fertility and Sterility**, v. 54, p.1-18, 1990.

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.; PINHEIRO, R. R. **Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Sobral, Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPC, n.50, 23 p, 2003.

ANDRIOLI-PINHEIRO, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R. M.; LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL, D. B.; RAIMONDO, R. F. S.; BRANDESPIN, F. B.; BIRGEL, E. H. Influência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 199 - 206, 2007.

BORZY, M. S.; CONNELL, R. S.; KIESSLING, A. A. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 1, p. 419-424, 1988.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.

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

CORK, L. C.; HADLON, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **The Journal of Infectious Disease**, v. 129, p. 134 - 141, 1974.

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

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. 1-2, n. 22, p. 71-87, 1995.

GUPTA, P.; MELLORS, J.; KINGSLEY, L.; RIDDLER, S.; SINGH, M. K.; SCHREIBER, S.; CRONIN, M.; RINALDO, C. R. High Viral Load in Semen of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Men at All Stages of Disease and Its Reduction by Therapy with Protease and Non nucleosided Reverse Transcriptase Inhibitors. **Journal of Virology**, Pennsylvania, v.71, n. 8, p. 6271-6275, 1997.

HO, D. D.; SCHOOLEY, R. T.; ROTA, T. R.; KAPLAN, J. C.; FLYNN, T.; SALAHUDDIN, S. Z.; GONDA, M. A.; HIRSCH, M. S. HTLV-III in semen and blood of healthy homosexual man. **Science**; v. 26, p. 451-453, 1984.

LEVY, J. A. The transmission of AIDS: the case of the infected cell. **Journal American Medical Association**, São Francisco, v. 27, p. 3037-3038, 1988.

LEVY, J. A. The transmission of HIV and factors influencing progression to disease. **Journal American Medical Association**, São Francisco, v. 95, p. 86-100, 1993.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (maedi-visna/ artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária**, v. 14, p. 77 - 78, 1986.

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

PATRICK, M. K.; JOHNSTON, J. B.; POWER, C. Lentiviral Neuropathogenesis: Comparative Neuroinvasion, Neurotropism, Neurovirulence, and Host Neurosensitivity. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 7923-7931, 2002

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. 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, p. 27-33, 2009.

QUAYLE, A. J.; XU, C.; MAYER, K. H.; ANDERSON, D. J. Tlymphocytes and macrophages, but not motile spermatozoa, are significant source of human immunodeficiency virus in semen. **Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 176, n.4, p. 960-968, 1997.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artimed, 2005. 511 p.

ROYCE, R. A.; SENA, A.; CATES, W. Jr; COHEN, M. S. Sexual transmission of HIV. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 336, p. 1072-1078, 1997.

ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THURMOND, W. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on a California dairy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 12, p. 2386-2395, 1992.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 2, p. 101 - 106, 1999.

VERNAZZA, P. L.; ERON, J. J.; COHEN, M. S.; VAN DER HORST, C. M.; TROIANI, L.; FISCUS, S. A. Detection and biologic haracterization of infectious HIV-1 in semen of seropositive men. **AIDS**. v. 8, n. 9, p. 1325, 1994.

WOLFF, H. The biologic significance of white blood cells in semen. **Fertility & Sterility**, v. 63, p. 1143-1157, 1995.

ZAGURY, D.; LEIBOVITCH, J.; SAFAI, B.; GROOPMAN, J. E.; FELDMAN, M.; SARNGADHARAN, M. G; GALLO, R. C. HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. **Science**, v. 226, p. 449-451, 1984.

ZANONI, R. "Lentiviruses: A Brief Review". **Etudes ET Syntheses de l'TEMVT**, n. 42, p. 1-8, 1993.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

INTRODUÇÃO

A atual produção pecuária deve ser fundamentada na exploração animal, em condições de bem estar animal e de respeito ao ambiente, com elevada produtividade, visando atender as necessidades humanas de forma socialmente justa e humanitária (CASTRO, 1998). Para se atingir esses objetivos, é essencial o conhecimento de fatores que interferem na saúde animal, bem como o controle dos custos da produção. Dentro deste novo contexto de produção pecuária, cuidados sanitários são fundamentais visto que doenças comprometem o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho acarretando perdas econômicas consideráveis. No caso específico da CAE, perdas diretas ocorrem pela diminuição da vida produtiva e produção leiteira, redução na duração do período de lactação e diminuição da eficiência reprodutiva (GREENWOOD, 1995; BIRGEL JUNIOR et al., 2007; BRITO, 2009).

As perdas indiretas também significativas decorrem da desvalorização dos rebanhos, reposição precoce de animais acometidos pela doença, despesas com medidas de controle, barreiras comerciais para produtos de multiplicação animal (matrizes, reprodutores, sêmen e embriões), dentre outras (PINHEIRO et al., 2003). Com base nessa realidade é fundamental se trabalhar com a perspectiva da futura erradicação da doença, contando com uma ampla colaboração dos produtores que deverão incluir as medidas de controle da CAE e os testes de diagnóstico como rotina em seus rebanhos.

1. ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) do inglês “Caprine Arthritis-Encephalitis” uma enfermidade infecciosa que acomete caprinos, provocada por um lentivírus denominado Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), é caracterizada por sua natureza crônica, multissistêmica e debilitante. Não há predileção por sexo, mas a suscetibilidade pode aumentar com a idade (RADOSTITS et al., 2002).

A infecção já foi descrita em várias partes do mundo como Europa, África, Oceania e no continente Americano, podendo ter uma variação na soroprevalência entre países e dentro destes (RADOSTITS et al., 2002). No Brasil é uma doença importante para a caprinocultura, pois acarreta perdas consideráveis neste setor, devido ao descarte de animais soropositivos, perdas de produtividade e morte de animais.

A principal via de entrada do vírus no organismo é através da ingestão de colostro e/ou leite de fêmeas infectadas. Pode ocorrer ainda transmissão horizontal pelo contato direto e prolongado entre os animais pelas fezes, saliva, secreções respiratória e urogenitais. Também já foi detectada a presença do vírus no sêmen, em células não espermiáticas presentes no ejaculado de animais infectados e até mesmo dentro do espermatozóide, podendo assim a monta natural e a inseminação artificial representar um risco potencial para a transmissão do vírus (ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; PAULA et al., 2009; RICARTE, 2009). Em fêmeas infectadas, o DNA pró-viral foi detectado no útero, oviduto e glândula mamária (FIENI et al., 2002), nas células *cumulus oophorus* (ALI AL AHAMAD et al., 2005), em células do córtex ovariano e em folículos pré-antrais ovarianos (SILVA, 2006).

A doença manifesta-se sob diferentes formas clínicas como a encefalite, artrite, pneumonia e mamite. Tem seu controle e erradicação dificultada, principalmente pela inexistência de vacinas eficazes, a falhas na detecção precoce de animais soropositivos, além do fato de muitos animais infectados serem assintomáticos (LARA, 2008), o que tem direcionado os caprinocultores a tomar soluções baseadas principalmente na profilaxia sanitária.

1.1. Agente Etiológico

O Vírus da Artrite-Encefalite Caprina CAEV é pertencente à família *Retroviridae*, e gênero *Lentivirus* (KLEVJER-ANDERSON et al., 1984; LARA et al., 2005). A este mesmo gênero pertencem outros vírus de importância em patologia veterinária e humana, como o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), o Maedi-Visna (MVV) dos ovinos, e os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV) (ZANONI, 1993; PATRICK et al., 2002).

O CAEV foi isolado de caprinos pela primeira vez por Crawford et al. (1980), embora a CAE tenha sido descrita pela primeira vez na década de 70, nos Estados Unidos (EUA) (CORK et al., 1974). É um vírus envelopado, de formato icosaédrico (Figura 1) e tem como material genético duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNA). A estrutura do envelope viral é composta por uma dupla camada de lipídeos, onde se encontram inseridas diversas glicoproteínas codificadas pelo vírus, apresentando ainda uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície (HUSO et al., 1988), o que dificulta a ação dos anticorpos neutralizantes. O capsídeo viral é composto de uma ou mais proteínas, as quais se encontram repetidas inúmeras vezes, arranjadas de tal forma a constituir um envoltório protetor ao redor do material genético

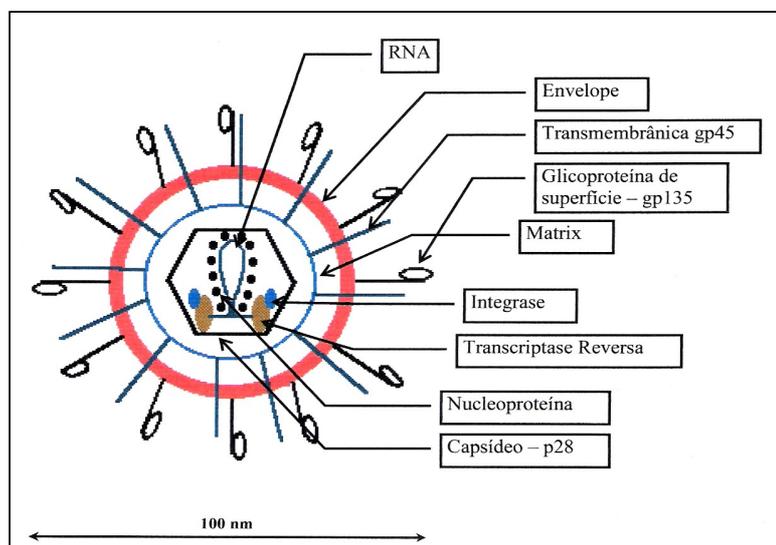


Figura 1. Estrutura do vírus da Artrite-Encefalite Caprina
Fonte: Pinheiro (2001), adaptado de Coffin (1996)

A primeira fase da infecção viral é a ligação da partícula viral com moléculas da superfície da célula hospedeira. As proteínas virais que promovem essa interação ligam-se, de forma específica aos receptores, encontrados em apenas alguns tipos de células linfócitos e monócitos, o que determina o tropismo celular do vírus. Logo após esta ligação, o vírus penetra na célula, sendo a fusão da partícula viral com a célula hospedeira, necessária para permitir a liberação do material genético viral para dentro do citoplasma ou núcleo, onde irá iniciar o processo de replicação viral e expressão dos genes virais (COFFIN, 1996; KREUTZ, 2001).

A patogenia do CAEV causa doença de caráter crônico com longo período de latência como os demais lentivírus, e inclui doenças neurológicas e imunológicas. (CLEMENTES; PEYNE, 1994). Os lentivírus penetram no organismo dos animais susceptíveis geralmente por via oral ou respiratória, caem na circulação sanguínea e infectam as células do sistema monocítico-fagocitário, que possui uma particular afinidade. A capacidade de infectar persistentemente os macrófagos, sem causar lise celular, facilita a disseminação do vírus no próprio hospedeiro (NARAYAN, 1982). Os monócitos infectados que não expressam o vírus, chegam ao cérebro, pulmões, articulações e outros órgãos, onde maturam para macrófagos que ativam a expressão do gene viral e os vírus então são produzidos nestes órgãos (CLEMENTES; PEYNE, 1994).

O CAEV é resistente à radiação ultravioleta e sensível a solventes lipídicos, formaldeído, ribonuclease e pH abaixo de 4,2, tendo sua infectividade destruída a 56°C quando submetido a um tempo mínimo de uma hora (HIRSH; ZEE, 2003).

1.1.1. Resposta imune ao CAEV

Os animais infectados desenvolvem respostas imunológicas celulares e humorais específicas para o CAEV. Nenhuma dessas previne a infecção persistente e muito menos a capacidade de o animal transmitir o vírus durante toda a vida (DAWNSON, 1989). Este fato se deve às características apresentadas pelo vírus que promovem a persistência da infecção em seus hospedeiros. 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. Em seguida, multiplica-se em células do sistema imunológico, 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). Por fim, o vírus acumula alta taxa de mutação durante o processo de replicação, escapando assim do sistema imunológico do hospedeiro (CHEEVERS et al., 1993).

A produção de anticorpos e sua concentração no sangue de um animal infectado são influenciadas por situações de estresse, condição alimentar, idade e pela presença de outras doenças (FRANKE, 1998). Além disso, tem-se observado que alguns animais infectados apresentam tardiamente anticorpos detectáveis por testes sorológicos (RIMSTAD et al., 1993).

A primeira resposta imune dirigida para a proteína do cápside é detectada por volta da terceira semana pós infecção e torno da quinta semana são formados anticorpos contra as demais proteínas do nucleocápside, matriz, glicoproteína transmembranária e glicoproteína de superfície (CONCHA-BERMEJILLO, 1997). Os anticorpos neutralizantes para glicoproteína de superfície são produzidos tardiamente, em quantidades limitadas, e são de baixa afinidade, de forma que não interrompem o ciclo de replicação viral (KENNEDY; NARAYAN, 1986; CHEEVERS et al., 1993)

A resposta celular é caracterizada pela proliferação de linfócitos TCD4+ (REYBURN et al., 1992) e TCD8+ (LICHTENSTEIGER et al., 1993), responsáveis pela destruição de células infectadas, porém não são capazes de destruir as que não expressam o pró-vírus.

1.2. Epidemiologia

No Brasil, no final dos anos 70 foram feitas importações de caprinos procedentes de vários países da Europa e America do Norte com o objetivo de introduzir material genético para melhorar a produção de leite de animais brasileiros. Nessas importações, realizadas sem adequada supervisão foi introduzida a CAE (MOOJEN et al., 1986).

A doença foi noticiada pela primeira vez por Moojen et al. (1986), em cabras no Rio Grande do Sul. No mesmo Estado, registraram pela primeira vez o isolamento do CAEV no Brasil e, posteriormente, evidências sorológicas e isolamento do vírus foram relatados, em diferentes estados do país (CALLADO et al., 2001).

No Ceará, o primeiro registro dessa infecção ocorreu em animais de raças leiteiras no município de Sobral (PINHEIRO et al., 1989).

Atualmente, a ocorrência de caprinos soropositivos tem sido registrada em quase todo território nacional (CALLADO et al., 2001). A tabela a seguir mostra alguns dos Estados brasileiros onde já foi diagnosticada a CAE.

Tabela 1. Tabela demonstrativa de alguns dos Estados brasileiros onde já foi diagnosticado o vírus da CAE.

Estado	Referência
Bahia	Fitterman 1988, Assis e Gouveia 1994
Ceará	Pinheiro et al. 1989, Assis e Gouveia 1994, Alves e Pinheiro 1997, Melo e Franke 1997
Maranhão	Alves e Pinheiro 1997
Minas Gerais	Assis e Gouveia 1994, Dezan 1996, Castro et al. 1999
Pará	Ramos et al. 1996
Paraíba	Souza e Alves 1999, Castro et al. 2000
Pernambuco	Castro et al. 1994, Saraiva Neto et al. 1995, Castro et al. 1990, Castro et al. 2000
Piauí	Pinheiro et al. 1996
Paraná	Sotomaior e Milczewski, 1997
Rio de Janeiro	Assis e Gouveia 1994, Cunha e Nascimento 1995
Rio Grande do Sul	Moojen et al. 1986, Dal Pizzol et al. 1989
São Paulo	Garcia et al. 1992

Fonte: Callado et al. (2001)

Apesar da doença causar grandes perdas à caprinocultura, medidas profiláticas para o controle e erradicação da doença no Brasil ainda são incipientes e a pouca informação sobre a CAE pelos caprinocultores tem limitado a implantação e avaliação de medidas de tratamentos profiláticos nas propriedades (PINHEIRO et al., 2001).

1.3. Sinais Clínicos

Do ponto de vista clínico a CAE é classificada em quatro formas básicas: nervosa, artrítica, respiratória e mamária (PUGH, 2004). Os animais também podem apresentar emagrecimento crônico progressivo (Figura 2) e debilidade apesar de manter a ingestão de alimentos nos níveis normais exigidos para a espécie. A infecção e/ou a soropositividade do animal não estão obrigatoriamente relacionados com a presença de sinais clínicos (WILKERSON et al., 1995).

A poliartrite crônica foi o primeiro relato de sintomatologia sugestiva da CAE descrito por Stünzi et al. (1964) na Suíça, posteriormente descrita no Japão por

Nakagana et al. (1971) e leucoencefalomielite foi descrita nos EUA (CORK et al., 1974) citados por Callado et al. (2001).



Foto: Kelma Costa de Souza

Figura 2. Reprodutor caprino soropositivo para o CAEV com emagrecimento crônico

A forma artrítica da doença (Figura 3) geralmente é observada em animais adultos (CRAWFORD; ADAMS, 1981). As alterações, aumento da consistência e tamanho das articulações, são observadas, mais frequentemente nas articulações carpianas, com menor frequência ocorre em outras articulações, como o jarrete (LARA et al., 2005). Com a evolução da doença, constata-se claudicação intensa, manifestação de dor e dificuldade de locomoção (PINHEIRO et al., 2005).

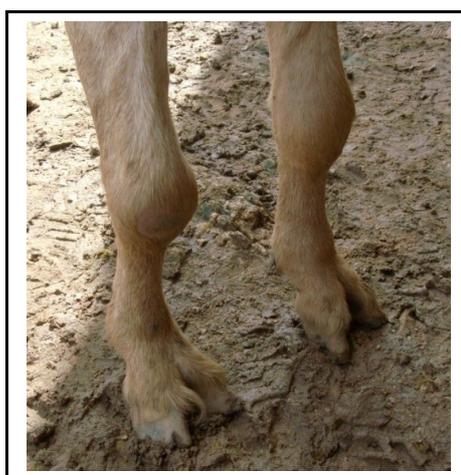


Foto: Kelma Costa de Souza

Figura 3. Articulação cárpica aumentada de fêmea soropositiva para o CAEV

A forma nervosa ou leucoencefalomielite, tem sido relatada em cabritos e seus sintomas são: fraqueza muscular, paresia ou ataxia dos membros posteriores, andar em

círculo, cegueira, tremores e inclinação da cabeça (CORK et al., 1974; LARA et al., 2005).

Em adição a sintomatologia articular e nervosa, os caprinos adultos infectados podem ter inflamação grave, progressiva e crônica em muitos órgãos e estruturas, como glândula mamária, pulmões, entre outros. Na maioria das vezes a infecção é sub-clínica e as lesões podem ser parcialmente determinadas pela resposta imune do hospedeiro e não pelo ataque direto do vírus (HIRSH; ZEE, 2003). As cabras afetadas pela forma mamária apresentam mastite aguda ou crônica. A aguda é observada geralmente em animais no final da primeira gestação, enquanto a crônica instala-se progressivamente durante a lactação e caracteriza-se pelo endurecimento do órgão com baixa ou nenhuma produção leiteira (CALLADO et al., 2001)

A pneumonia intersticial manifestada, ou como sinal sub-clínico, é frequentemente observada em caprinos infectados em qualquer idade, os sintomas mais significativos são: tosse seca quando presente, aumento da frequência respiratória e intolerância ao exercício, o qual após este, o animal apresenta intensa dispnéia (SIMS et al., 1983).

1.4. Transmissão

O reservatório e a fonte de infecção do CAEV são os próprios caprinos infectados e seus fluidos orgânicos, sendo recomendada a retirada destes do rebanho, para impedir que permaneçam disseminando a CAE para todo o plantel.

1.4.1. Transmissão vertical do CAEV

A transmissão vertical do CAEV segundo Blacklaws et al. (2004), pode ocorrer, por via transplacentária ou no útero, visto que o vírus está presente no fluido uterino (ANDRIOLI-PINHEIRO, 2001). O DNA pró-viral do CAEV também foi detectado nas fêmeas, no oviduto e ovário (FIENI et al., 2003), nas células do *cumulus oophorus* (ALI AL AHAMAD et al., 2005) em células do córtex ovariano e em folículos pré-antrais ovarianos (SILVA, 2006).

A transmissão do CAEV pode ocorrer também no canal vaginal através da ingestão de fluidos maternos pela cria (ADAMS et al., 1983; ELLIS et al., 1986; EAST et al., 1993). Esses mesmos autores, observaram a soroconversão de crias de cabras soropositivas tanto de parto assistido, evitando o contato com a mãe, como por cesariana, e ainda de crias nascidas de cabras infectadas que foram separadas imediatamente após o parto e receberam colostro e leite de vaca pasteurizado. Porém, em trabalho mais recente, Lara et al. (2005), estudaram a capacidade do CAEV infectar o feto ou cabritos neonatos por via transplacentária e no parto respectivamente de 26 animais, sendo que nenhum cabrito nasceu soro reagente aos antígenos do vírus, indicando que a possibilidade de transmissão vertical transplacentária da infecção foi menor do que 3,8%.

1.4.2. Transmissão horizontal do CAEV

A transmissão horizontal pode ser classificada em direta e indireta (BLACKLAWS et al., 2004).

1.4.2.1. Transmissão horizontal indireta do CAEV

Dentre as formas indiretas a transmissão iatrogênica também pode ocorrer, mecanicamente por agulhas e outros instrumentos perfuro-cortantes contaminados com sangue ou secreções de animais infectados. LARA et al. (2003) verificaram a soroconversão de 100% dos cabritos após inoculação indireta utilizando tatuador contaminado com sangue de animal infectado.

Pode ocorrer ainda a infecção por ordenha mecânica, pois ordenhadeiras podem armazenar leite contaminado, e em uma próxima ordenha, este leite penetre na glândula mamária através do teto em outra fêmea (ADAMS et al., 1983), entretanto poucos estudos foram realizados sobre esta questão.

A Transferência de Embrião (TE) parece ser a via de transmissão mais improvável, pois, para que ocorra a veiculação de um microrganismo através da TE é

necessário que ocorra alguns eventos como: exposição do embrião ao patógeno, ou seja, que esteja presente no fluido uterino ou nos meios nos quais os embriões são manipulados; que ocorra a infecção embrionária ou haja aderência do agente à Zona Pelúcida (ZP) do embrião; sobrevivência do agente ou do embrião, entre outros (SINGH, 1987; STRINGFELLOW et al., 1991, WRATHALL, 1995). Andrioli et al. (2002a,b) e Blacklaws et al. (2004), evidenciaram que embriões tratados segundo as normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) apresentam pouco risco de serem infectados. Além disso, Andrioli et al. (2002b) coletaram embriões com ZP íntegra de cabras soropositivas e transferiram, após a lavagem dos embriões (IETS), para cabras soronegativas. As receptoras e crias mantiveram-se saudáveis até os 16 meses após o desafio.

Andrioli et al. (2002a) isolaram o CAEV das secreções uterinas recolhidas juntamente com o PBS, na colheita de embriões de cabras infectadas pelo vírus, porém não encontraram o CAEV no embrião, indicando a TE como uma técnica segura para obtenção de crias negativas de cabras infectadas pelo CAEV. Outros autores também encontraram resultados satisfatórios com TE quando realizaram a lavagem dos embriões para outros patógenos (WRATHALL, 1995).

1.4.2.2. Transmissão horizontal direta do CAEV

Dentre esses tipos de transmissão, a principal via é a digestiva, geralmente, no período neonatal, com ingestão pela cria de colostro e/ou leite de cabras enfermas (PUGH, 2004). A transmissão digestiva foi evidenciada por Adams et al. (1983) e Ellis et al. (1986) ao observarem que alguns cabritos alimentados apenas de colostro, tornaram-se infectados. E segundo Gedek et al. (1993), cabras soropositivas eliminam o vírus durante toda a vida, tanto pelo leite como também por outras secreções, servindo desse modo como reservatórios do vírus. Até o soro do leite dessas cabras que muitas vezes é utilizada na alimentação de animais adultos pode transmitir o CAEV (RUSSO et al., 1997).

Estudos evidenciam também que o contato direto e prolongado entre animais representa um importante fator na transmissão do vírus, pelo contato com saliva, secreção respiratória e urogenital dos animais infectados, dependendo da situação

particular de cada criação (BLACKLAWS et al., 2004). O risco de ocorrer este tipo de transmissão em caprinos, é porque estes animais têm hábitos comportamentais como bufar e tossir ao se alimentarem liberando descargas nasais e orais, o que pode favorecer a transmissão do CAEV.

A transmissão sexual tem sido sugerida como uma potencial forma de infecção, pois, já foi detectada a presença do DNA pró-viral no sêmen, de machos natural e experimentalmente infectados, podendo assim a monta natural e a inseminação artificial representarem um risco para a transmissão do vírus (ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; PAULA et al., 2009). O DNA pró-viral do CAEV em reprodutores caprinos apresenta caráter intermitente em sua detecção, sugerida por alguns autores como uma eliminação sazonal ligada ao aumento da atividade sexual e ao estresse durante a estação reprodutiva (ANDRIOLI et al., 2006; PETERSON et al., 2008). Andrioli et al. (2006) ressaltam que danos testiculares promovem um aumento na eliminação do DNA pró-viral do CAEV no sêmen. Ali Al Ahmad et al. (2007) e Oliveira et al. (2009) demonstraram a presença do RNA genômico no sêmen de caprinos infectados.

Recentemente, Peterson et al. (2008) observaram a presença do DNA pró-viral na fração composta de agregados e partes de espermatozóides no sêmen de animais infectados, separado pelo gradiente de Percoll. Nesse mesmo trabalho foi encontrado DNA pró-viral em *debris* citoplasmáticos, macrófagos e células originárias de órgãos sexuais. Ricarte (2009) visualizou por microscopia eletrônica de transmissão, uma partícula viral do CAEV na peça intermediária do espermatozóide de um caprino infectado, no interior das vesículas concluindo que espermatozóides caprinos podem ser infectados pelo vírus. Essas detecções são fundamentais para programas de controle da CAE, considerando-se o risco do uso de reprodutores infectados, quer sejam utilizados em monta natural quer em inseminação artificial (ANDRIOLI et al., 2006)

Estudos verificando a correlação da carga viral sanguínea e seminal com a transmissão sexual do CAEV vêm sendo desenvolvidos. Paula et al. (2009) avaliando o perfil viral do sangue e sêmen de reprodutores naturalmente e experimentalmente infectados, observaram que das amostras coletadas houve um quantitativo de 12,50% e 17,14% de resultados positivos do sangue e 10,98% e 11,25% de positivos no sêmen dos animais naturalmente e experimentalmente infectados respectivamente, demonstrando que machos com infecção recente também representam importantes fontes de infecção. Já Ali Al Hamad et al. (2007) não encontrou uma correlação positiva

entre a presença do vírus no sangue e sêmen, portanto, uma ausência de carga viral no sangue não exclui a excreção do agente patogênico no plasma seminal. Desse modo, Pinheiro et al. (2001) sugere que a utilização de reprodutores caprinos pode ter um papel relevante na contaminação e disseminação do Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR).

1.5. Diagnóstico

Pelas características da doença e por não existirem sinais clínicos, torna-se necessário o auxílio de testes laboratoriais que permitam seu diagnóstico (ABREU et al., 1998). O diagnóstico da infecção pelo CAEV geralmente é feito através de técnicas diretas, como isolamento viral e a detecção do DNA pró-viral pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e indiretas, por meio da detecção de anticorpos (Ac) no soro (PINHEIRO et al., 2001). Os principais testes sorológicos empregados para a detecção são a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) (TIGRE et al., 2006), ELISA e *Western Blot* (WB) (RUTKOSK et al., 2001). Algumas destas técnicas disponíveis no momento têm demonstrado um importante papel na investigação da CAE nos rebanhos e tem permitido fazer testes de triagem e, subsequentemente separação ou eliminação dos soropositivos.

Associada às técnicas de diagnóstico, usa-se como ferramenta auxiliar para diagnosticar a manifestação clínica da CAE o Índice Articular Clínico (IAC) (GARCIA,1993; PINHEIRO et al., 2005) que é calculado através da diferença entre a maior medida dos diâmetros das articulações carpo-metacarpiana e a menor medida do diâmetro do metacarpo. Na interpretação, quando a média do IAC for igual ou inferior a 5,5 cm o animal é considerado clinicamente negativo para a artrite, se o IAC estiver entre 6,0 e 6,5 cm, clinicamente suspeito e com um índice igual ou superior a 7,0 cm o animal passa a ser considerado com artrite.

1.5.1. Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)

O IDGA é o teste recomendado pela (OIE, 1996) *Organização Mundial de Saúde Animal* por ser uma técnica simples, de fácil uso, sendo utilizada sobretudo, para testes de triagem. A técnica baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo que se insolubilizam e precipitam no gel, em uma placa de Petri ou em uma lâmina de microscópio, onde desenvolve-se a linha de precipitação visível entre os orifícios no ponto em que é alcançada a relação ótima entre antígeno e anticorpo (ROITT et al., 1998; TORTORA et al. 2000).

Embora o IDGA, quando comparado a outros testes como ELISA e WB apresente menor sensibilidade, ainda é o método mais utilizado para a detecção de anticorpos contra os lentivírus (PINHEIRO et al., 2006). É um teste útil para o diagnóstico do rebanho, mas tem pouco valor no diagnóstico individual (OGILVIE, 2000).

Como desvantagem do IDGA, relata-se que o teste somente detecta altos níveis de imunoglobulinas nos indivíduos, o que permite a ocorrência de falso-negativos no rebanho (ANDRIOLI et al., 2006a; TIGRE et al., 2006). Essas restrições referem-se exatamente a problemas de sensibilidade, especificidade (reações inespecíficas), e tempo para a obtenção dos resultados. Mesmo assim, é amplamente utilizada para o diagnóstico sorológico de várias infecções víricas, incluindo vírus da Leucose Bovina (VLB), da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), da Língua Azul (BTV), da Doença de Gumboro, das Bronquites infecciosas, da Febre Aftosa, entre outras.

Segundo Vitu et al. (1982), animais experimentalmente infectados com MVV podem ser identificados por o IDGA cerca de quatro a cinco meses pós infecção.

1.5.2. *Western Blot* (WB)

A técnica baseia-se na detecção de pequenas quantidades de proteínas adsorvidas em uma membrana de nitrocelulose pela reação com anticorpos específicos. Estes anticorpos podem ser imobilizados e transferidas por forças elétricas. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor a reação. Towbin et al. (1979), afirmam que o uso de nitrocelulose apresenta uma melhor capacidade para detectar o substrato.

Segundo Pinheiro et al. (2009), o WB é mais sensível que o IDGA na detecção de Ac contra o CAEV. Entretanto, não é usado como teste de seleção, por necessitar de maior tempo para ser executado e exigir uma estrutura laboratorial mais complexa, como aquisição de equipamentos, equipe treinada, cuidados com contaminações, além do fato de ter alto custo.

O WB é classificado como o teste complementar, sendo denominado padrão ouro na validação de outros testes. Apresenta como vantagem menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos (ZANONI et al., 1989).

1.6. Controle e Profilaxia

A CAE possui difícil controle, devido à ocorrência de portadores assintomáticos, inexistência de vacinas eficazes e lenta produção de anticorpos (JOAG, 1996). O vírus apresenta grande período de incubação, e a infecção e/ou soropositividade não estão obrigatoriamente relacionados com a presença de sinais clínicos, uma vez que apenas 35% dos animais infectados apresentam sintomatologia da doença (WILKERSON et al., 1995), adicionado a resultados falso-negativos pelas técnicas de diagnóstico usuais (PINHEIRO et al., 2001). A sintomatologia clínica é muito menos comum que a infecção, e a incidência anual da doença, em rebanhos intensamente infectados, geralmente é baixa, aproximadamente de 10% (RADOSTITS et al., 2002).

As medidas profiláticas são consideradas extremamente importantes para que se tenha um bom controle da enfermidade. A prevenção se baseia na diminuição dos riscos de infecção pelo vírus, através de testes sorológicos periódicos com a eliminação dos animais soropositivos. Animais recém adquiridos devem ser mantidos em quarentena e testes sorológicos devem ser realizados com objetivo de evitar a entrada do vírus no rebanho, que quando livres da CAE normalmente se infectam com a introdução de novos animais. Correa et al. (2001), recomendam ainda a formação de dois rebanhos, um com caprinos positivos e outro com negativos mantidos separadamente. Uma eliminação gradativa dos caprinos afetados é uma medida eficaz no controle da infecção.

Outras medidas de controle incluem: exames sorológicos de rotina nos animais, limpeza periódica das instalações (PUGH, 2004; OLIVEIRA, 2006), e estabelecimento de uma linha de ordenha onde as fêmeas soropositivas e/ou suspeitas sejam ordenhadas por último (OLIVEIRA, 2006; SIMARD, 2008). Estas medidas podem reduzir a ocorrência de soroconversão. Além disso, os cabritos devem ser separados das mães positivas logo após o nascimento e esses deverão ser alimentados com colostro e leite termicamente tratados (REILLY et al., 2002). O tratamento térmico a 56°C por uma hora inativa o vírus e o colostro pode ser congelado, para próximos fornecimentos (GOUVEIA, 1996; BOMFIM et al., 2006).

Materiais cirúrgicos devem ser criteriosamente esterilizados. Canivetes, tatuadores, tesouras e outros devem ser mergulhados em água fervente antes de serem utilizados em diferentes animais (GOUVEIA, 1994). Usar somente agulhas descartáveis também ajudam a evitar essa possível rota de transmissão (EAST, 1993).

Cabras soronegativas devem ser cobertas por bodes soronegativos ou inseminadas com sêmen livres do vírus (SMITH, 1993).

O Programa Nacional de Sanidade de Caprinos e Ovinos (PNSCO-MAPA) contempla o controle da CAE nas propriedades de caprinos, sendo sua adesão voluntária.

2. SISTEMA REPRODUTOR DOS CAPRINOS

2.1. Sêmen e formas de contaminação

A saúde dos machos constitui fator decisivo para programas de melhoramento, utilizando tanto monta natural como inseminação artificial.

O Sêmen é produto da ejaculação e consiste em componentes celulares, os espermatozoides que são os gametas masculinos, e uma suspensão acelular líquida contendo secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino, que é conhecida como plasma seminal (HAFEZ; HAFEZ, 2004; REECE, 2006). Podem estar presentes no sêmen outras células além dos espermatozoides como os leucócitos, células epiteliais e células germinativas imaturas.

Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, a partir de células germinativas (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Sua estrutura é composta de cabeça, colo, peça intermediária e flagelo (WOLFF et al., 1995). A figura 4 mostra a estrutura de um espermatozoide.

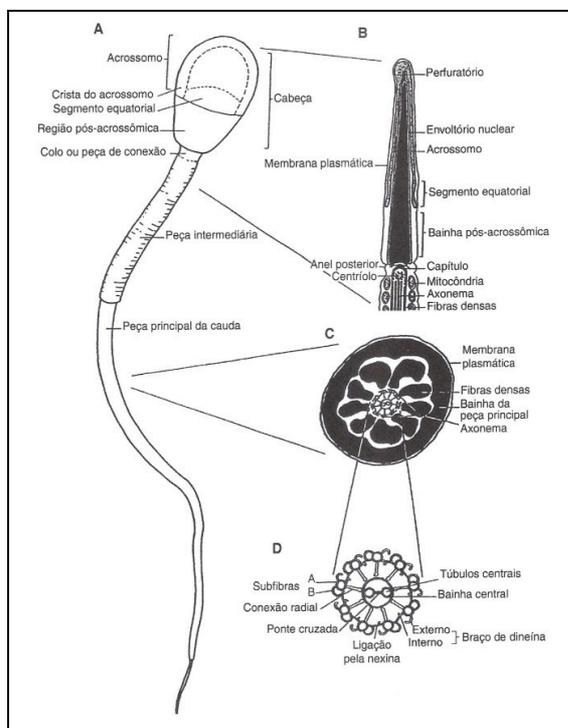


Figura 4. Estrutura e forma do espermatozoide
Fonte: Reece (2006)

O plasma seminal é o produto de secreções dos testículos, epidídimos e glândulas acessórias do macho (REECE, 2006), que se integra aos espermatozoides na ejaculação servindo como meio de sobrevivência e de transporte para as células espermáticas (EVANS; MAXWELL, 1990). O plasma seminal é rico em nutrientes, que ativa a motilidade dos espermatozoides, tem pH próximo a sete e contém ainda uma enorme variedade de constituintes bioquímicos (STREZEZEK et al., 1992), aminoácidos, açúcares, ácido cítrico, minerais, fosfatases, prostaglandinas e proteínas que estão presentes no plasma seminal (EVANS; MAXWELL, 1990).

A utilização de sêmen requer um cuidado redobrado, visto que, este pode se contaminar de várias formas. Além do mais, existe uma variação da detecção do lentivírus em ejaculados de um mesmo animal, pois, a presença do DNA pró-viral no sêmen caprino não é constante (ANDRIOLI et al., 2006; PAULA et al., 2009), fato este

que está de acordo com Concha-Bermejillo et al. (1996), que observaram que a presença do MVV em sêmen de ovinos também é intermitente. Jordan et al. (1999), também observaram que a presença do lentivírus nos ejaculados de gatos variam tanto entre os animais quanto nos vários ejaculados de um mesmo animal.

Existem ainda fatores que contribuem para a maior expressão do vírus tais como a injúria celular (ANDRIOLI et al., 2006) e/ou a concomitância com outros agentes patogênicos no sistema reprodutor, inclusive bactérias (CONCHA-BERMEJILLO, 1997; ANDRIOLI et al., 2003). Além disso, o sêmen pode infectar-se por patógenos procedentes dos testículos, epidídimo, glândulas anexas, uretra ou prepúcio, ou os patógenos podem ter acesso ao sistema reprodutor pelo sangue e líquidos tissulares extravasados para este sistema, nas bacteremias ou viremias, ou no caso de qualquer inflamação ou infecção nestes órgãos (HARE, 1985; THIBIER; GUÉRIN, 2000). Também pode haver contaminação no meio externo, por microrganismos presentes no ambiente, na pele do reprodutor, nos materiais não adequadamente esterilizados utilizados na sua coleta e manipulação, e no caso da congelação em nitrogênio líquido, a partir de outras amostras contaminadas (HARE, 1985; THIBIER; GUÉRIN, 2000).

Philpott (1993) e Andrioli et al. (2006) evidenciaram ainda a viabilidade do CAEV em amostras de sêmen criopreservados, o que confirma que a congelação do sêmen possibilita a sobrevivência do vírus assim como de outros microrganismos.

2.2. Imunologia do Sistema Reprodutor da Fêmea

O revestimento interno do trato reprodutivo da fêmea tem continuidade com o ambiente externo ao animal, assim como os sistemas respiratório e o gastrointestinal, e desta forma estão continuamente sujeitos à invasão por organismos microbiológicos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A função imune no trato reprodutivo é mantido pela presença de um eficiente sistema de defesa antimicrobiano, que inclui barreiras físicas e células, como os fagócitos que englobam e eliminam microrganismos; linfócitos B que produzem anticorpos contra microrganismos invasores, sendo a imunoglobulina IgA a de particular importância para o sistema reprodutivo (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Fazem

parte ainda da imunidade do trato reprodutivo os linfócitos T, que são capazes de destruir células do hospedeiro infectadas por vírus e bactérias. As células do sistema imune estão presentes no trato reprodutivo em todos os estágios do ciclo reprodutivo (LANDER CHACIN et al., 1990).

A população de células é regulada pelos hormônios esteróides (estradiol e progesterona), sendo observada a maximização da função antimicrobiana durante o estro, quando a probabilidade de desafios microbianos é alta, e a redução da função imune durante os períodos de secreção elevada de progesterona, quando a deposição de microrganismos como parte do processo de acasalamento é improvável e quando o conceito, está presente no útero (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O estrógeno aumenta a migração de células que promovem a inflamação do trato reprodutivo, dentre elas, o eosinófilo, que acumula-se especialmente no oviduto, durante o estro, na vaca (MATSUDA et al., 1983).

A produção local de anticorpos também é regulada por esteróides ovarianos em algumas espécies. Por exemplo, o número de plasmócitos no trato reprodutivo da porca aumenta durante o estro. Na égua, as concentrações de IgA no fluido uterino, mas não de IgG, foram reportados como sendo maiores durante o estro do que durante a fase luteínica (LEBLANC et al., 1998). Hormônios esteróides podem regular a função dos neutrófilos no útero, sendo que o efeito depende da espécie e da natureza do agente usado para atrair os neutrófilos até o útero. Em vacas, por exemplo, o número de leucócitos que invadiram o útero após a injeção de *Escherichia coli* foi maior durante o estro (HAWK et al., 1964). Além de afetar mecanismos antibacterianos, a progesterona parece ter um papel de maior importância durante a gestação, inibindo respostas imunes uterinas. Assim, o tratamento de ovelhas com progesterona provoca uma diminuição no número de linfócitos no endométrio (GOTTSHALL et al., 1992) e permite a sobrevivência prolongada de enxertos dentro do útero (HANSEN, 1997).

O processo de acasalamento pode levar à contaminação microbiana na vagina, se o pênis e algumas vezes o plasma seminal estiverem contaminados. A cérvix é a principal barreira física ao movimento progressivo de microrganismos para dentro do trato reprodutivo, sua função medida em parte, pelas suas próprias secreções, que formam um tampão espesso no lúmen cervical durante a gestação. No momento do parto, a cérvix é distendida e os tecidos placentários podem promover a passagem de microrganismos para dentro do útero. Outras lesões mecânicas e ambientais também

podem levar à introdução de microrganismos dentro do trato reprodutivo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P. R.; CARLSON, J. L. McGUIRE, T. C.; GORHAM, J. R.. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary**, v. 44, n. 9, p. 1670-1675, 1983.

ABREU, S. R. O; ROBERTO, S.; NASCIMENTO, S. A.; SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n. 2, p. 57-60, 1998.

ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L.; CHATAGNON, G.; BARIL, G.; BOUVIER, F.; CHEBLOUNE, Y. 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, p. 1656–1666, 2005.

ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J .L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A. B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, p. 473-480, 2007.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G; ANDRADE, J. S.; PINHEIRO, R. R.; YORINORI, E. H; SILVA, M. X . Diagnostic of the caprine arthritis encephalitis virus in uterine fluid and embryos of goats by virus isolation in cell culture and PCR Nested. **Theriogenology**, v. 57, p. 567-567, 2002a.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; SOBRINHO-MOURA, 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, 2002b.

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**, Brasília, v. 41, n. 8, p. 1313 - 1319, 2006.

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.; PINHEIRO, R. R. **Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase.** Sobral, Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPC, n. 50, 23 p, 2003.

ANDRIOLI-PINHEIRO, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. Protocolo para extração do DNA pró-viral e PCR do lentivírus caprinos em sangue. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006a. 5 p. (Comunicado Técnico, 72).

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, G.; TORSTEINSPOTTIR, S.; WATT, N. J.; DEANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G.D. Transmission of small ruminant lentivirose. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 199-208, 2004.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa.** Ames: Iowa State University Press, 285 p, 1989.

BIRGEL JÚNIOR, E. H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R. M.; LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL, D. B.; RAIMONDO, R. F. S.; BRANDESPIN, F. B.; BIRGEL, E. H. Influência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 199 - 206, 2007.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras.** 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.

BOMFIM, M. A. D.; BARROS, N. N.; CAVALCANTE, A. C. R. Manejo alimentar de caprinos para a produção de leite. In: LIMA, G. F. C.; HOLANDA JUNIOR, E. V.; MACIEL, F. C.; BARROS, N. N.; AMORIM, M. V.; CONFESSOR JUNIOR, A. A. **Criação familiar de caprinos e ovinos no Rio Grande do Norte.** Natal: EMATER-RN, EMPARN, Embrapa Caprinos, 2006. Cap. 12. p. 279 - 297.

CASTRO, R. S. Efeito da CAE (Artrite-Encefalite Caprina) na saúde e produtividade de cabras leiteiras. Disponível em: <<http://www.capritec.com.br/art14.htm>. Acesso em 08 fev de 2010.

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

CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T.; NORTON, L. K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES D. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. **Virology**, San Diego, v. 196, n. 2, p. 835-839, 1993.

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

COFFIN, J. M. Retroviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. N. et al. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1767 - 1847.

CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n.1, p. 13-33, 1997.

CONCHA-BERMEJILLO, A; MAGNUS-CORRAL, S; BRODIE, S. J.; DEMARTINI, J.C. Veneral shedding of ovine Lentivirus in infected rams. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 5, p. 684-688, 1996.

CORK, L. C.; HADLON, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **The Journal of Infectious Disease**, Chicago, v. 129, p. 134 - 141, 1974.

CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de ruminantes e eqüinos**, v.1. São Paulo: Varela, 2001. 426p.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v. 207, n. 4434, p. 997 - 999, 1980.

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

DAWSON, M. The caprine arthritis-encephalitis syndrome. **Veterinary Annual**. v. 29, p. 98-102, 1989.

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, p. 251 - 262, 1993.

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

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminação artificial de ovelhas y cabras**. Zagarosa: Editorial Acribia, 149 p. 1990.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. 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.; HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. **Theriogenology**, v. 59, p. 1515-1523, 2003.

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

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

GEDEK, B.; KAADEN, O.R.; MAHNEL, H. **Spezielle Virologie**. In: ROLLE, M. & MAYR, A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions - und Seuchenlehre. Ferdinand Enke, Stuttgart, 6 ed., cap. 3, p. 227-467, 1993.

GOTTSHALL, S. L.; HANSEN, R. J. Regulation of leukocyte subpopulations in the sheep endometrium by progesterone. **Immunology**, v. 76, p. 636-641, 1992.

GOUVEIA, A. M. G. **Relatório de consultoria: área sanidade animal**. Sobral, CE: Embrapa – CNPC, 1996. 122 f.

GOUVEIA, A. M. G. **Relatório de consultoria**: setor sanidade animal. Sobral, CE: Embrapa – CNPC, 1994. 162 f.

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. 1-2, n. 22, p. 71-87, 1995.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HANSEN, P. J. Interactions between the immune system and the bovine conceptus. **Theriogenology**, v. 47, p. 121-130, 1997.

HARE, W. C. D. **Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferancia de embriones**. France: Officece Internacional des Epizooties, 1985. p.83. (Série Técnica n°4).

HAWK, H. W.; BRINSFIELD, T. H.; TURNER, G. D.; WHITMODE, G. W.; NORCROSS, A.C. Effect of ovarion status on induced acute inflamatore response in catte uteri. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 362-366, 1964

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 411 - 424, 2003.

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

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

JORDAN, H.L.; LIANG, Y.H.; HUDSON, L.C.; TOMPKINS, W.A. hedding of feline immunodeficiency virus in semen of domestic cats during acute infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 211-215, 1999.

KENNEDY-STOSKOPF, S.; NARAYAN, O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. **Journal of Virology**, v. 59, p. 37-44, 1986.

KLEVJER-ANDERSON, P.; ADAMS, D. S.; ANDERSON, L. W.; BANKS, K. L.; AND McGUIRE, T.C. A sequential study of virus expression in retrovirus-induced arthritis of goats. **Journal of General Virology**, v. 65, p. 1519-1525, 1984.

KREUTZ, L. C. **Imunidade contra vírus**. In: MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p 19-45.

LANDER CHACIN, M. F.; HANSEN, P. J.; DROST, M. Effects of stage of the estrous cycle and steroid treatment on uterine immunoglobulin content and polymorphonuclear leukocytes in cattle. **Theriogenology**, v. 4, p. 1169-1184, 1990.

LARA, M. C. C. S. H. **Artrite-Encefalite dos Caprinos (CAE)**. 2008. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/artrite/index.htm>. Acesso em: 18 dez. 2009.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 553 - 555, 2005.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; FERNANDES, M. A.; BIRGEL, E. H. Infecção experimental do vírus da artrite-encefalite dos caprinos em cabritos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 512-54, 2003.

LEBLAC, M. M.; HANSEN, R. J.; BUHI, W. C. Uterine protein secretion in postpartum and cyclic mares. **Theriogenology**, v.2 9, p. 1303-1316, 1998.

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

MATSUDA, H.; OKUDA, K.; IMORI, T. Tissue concentrations of eosinophils in the bovine oviduct and uterus at different stages of the estrous cycle. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 369-370, 1983.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (maedi-visna/ artrite encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária**, v. 14, p. 77 - 78, 1986.

NARAYAN, O. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna virus of sheep and goats. **Journal of General Virology**, v. 59, n. 2, p. 345-56, 1982.

NARAYAN, O.; ZINK, C. M.; GORREL, M.; MCENTEE, M.; SHARMA, D.; ADAMS, R. Lentiviruses induced arthritis in animals. **Journal Rheumatol Supplement**, v. 32, p. 25-32, 1992.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. World Organization for Animal Health. p. 369-373, 1996.

OLIVEIRA, A. A. F. Sanidade animal. In: CHAPAVAL, L.; OLIVEIRA, A. A. F.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A.; ARAÚJO, A. M.; OLIVINDO, C. S. **Manual do produtor de cabras leiteiras**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2006. Cap. 6. p. 128 - 155.

OLIVEIRA, A. N.; VERAS, A. K. A.; KADRI, S. M.; FRANCO, M. M.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI-PINHEIRO, A.; SIDER, L. H. Padronização das técnicas de processamento e extração de RNA viral de amostras de sêmen caprino. In: Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual Vale do Acaraú, 11, 2009, Sobral, **Anais...** Sobral, 2009.

OGILVIE, T. H. **Medicina interna de grandes animais**. Porto Alegre: Artmed, 2000p. 280-326.

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. 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, p. 27-33, 2009.

PATRICK, M. K.; JOHNSTON, J. B.; POWER, C. Lentiviral Neuropathogenesis: Comparative Neuroinvasion, Neurotropism, Neurovirulence, and Host Neurosensitivity. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 7923-7931, 2002

PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 433-442, 2008.

PHILPOTT, M. The dangers of disease transmission by artificial insemination and embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v. 149, p. 339-369, 1993.

PINHEIRO, R. R.; EGITO, A. S., SANTA ROSA, J.; PINHEIRO, A. A. **Artrite encefalite caprina viral (CAEV)**. Sobral, CE: EMBRAPA-CNPC, 1989. p.5, (EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico, 19).

PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. **Viroses de pequenos ruminantes**. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2003. 30 p. (Série Documentos, 46).

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo Vírus da Artrite-Encefalite Caprina no Estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 449- 454, 2001.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A. Medidas carpo-metacarpianas como índice articular clínico em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 170 - 173, 2005.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; TORRES, A. M. C.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. Custo dos antígenos e dos testes de diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, p.110-113, 2006.

PINHEIRO, R. R.; SOUSA, A. R.; BRITO, R. L. L.; SANTOS, V. W. S.; ANDRIOLI, A.; DIAS, R. P.; FURTADO, J. R.; ALVES, F. S. F. Métodos sorológicos indiretos para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina. In: SIMPÓSIO EMBRAPA LABEX DE SANIDADE ANIMAL, 1, 2009, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2009.

PUGH, D. C. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1098-1101, 2002.

REECE, W. O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926 p.

REILLY, L. K.; BAIRD, A. N.; PUGH, D. G. Diseases of the musculoskeletal system, In: PUGH, D. G. **Sheep & Goat Medicine**, 1ª ed. Philadelphia: Saunders, 2002, p. 239-240.

REYBURN, T. H.; ROY, J. D.; BLACKLAWS, A. B.; SARGAN, R.; WATT, J. N.; McCONNELL, I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to Maedi-Visna virus. **Virology**, v. 141, n. 2, p. 1009-1012, 1992.

RICARTE, A. R. F. **Avaliação da susceptibilidade de gametas e embriões caprinos ao vírus da artrite encefalite caprina**. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2009.

RIMSTAD, E.; EAST, N. E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; De ROCK, E.; PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p.1858-62, 1993.

ROITT, I.; BROSTOFF, J. MALE, D. **Immunology**. 5ª ed, London: Mosby, 1998.423 p.

RUSSO, P.; VITU, C.; BOURGONE, A. VIGNONI, M.; ABADIE, G.; PÉPIN, M.; DAVID V. Caprine arthritis-encephalitis vírus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. **Veterinary Record**, v. 140, n. 18, 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 de polimerase com “primers” degenerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 635-640, 2001.

SILVA, J. B. A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas**. 2006. 148f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias - Área de Reprodução e Sanidade Animal) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

SIMARD, C. Contrôle de L'Arthrite Encéphalite Caprine: une approche rentable. Disponível em: <http://www.agrireseau.qc.ca/caprins/Documents/Simard_Carole.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2008.

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.

SINGH, E. L. The disease control potential of embryos. **Teriogenology**, v. 27, n.1, p. 9-20, 1987.

STREZEZEK, J.; KORDAN, W.; KOSTYRA, H.; ZABORNIK, A. Purification and partial characterization of a 5,700 KDa sperm motility inhibiting factor from seminal plasma of boar. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 29, p. 5-52, 1992.

STRINGFELLOW, D. A.; RIDDELL, K. P.; ZUROVAC, O. The potential of embryo transfer for infectious disease control in livestock. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 39, p. 8-17, 1991

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 233-251, 2000.

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**, Salvador, v. 5, n. 2, p. 124 - 131, 2006.

TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 2, p. 101-106, 1999.

TORTORA, G.J, FUNKE, B.R., CASE, C.L. **Microbiologia**, 5ed., editora ArtMed, Porto Alegre, 2000, 827p.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, p. 4350-4354, 1979.

VITU, C.; RUSSO, P.; VIGNE, R.; QUERAT, G.; GIAUFFRET, A. Na ELISA Test For Detection Of Maedi-Visna antibodies. Comparative study with Gel Immunodiffusion and complement fixation test. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease**. v. 4, n. 5, p. 469-481, 1982.

WILKERSON, M. J.; DAVIS, W. C.; BASLER, T.V.; CHEEVERS, W. P. Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p. 1433-1443, 1995.

WOLFF, H. The biologic significance of white blood cells in semen. **Fertility & Sterility**, v. 63, p. 1143-1157, 1995.

WRATHALL, A.E. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. **Theriogenology**, v. 43, p. 81-88, 1995.

ZANONI, R. "Lentiviruses: A Brief Review". **Etudes ET Syntheses de l'EMVT**, n. 42, p.1-8, 1993.

ZANONI, R.; KREIG, 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, n. 3, p. 580 - 582, 1989.

CAPÍTULO 2

TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA ATRAVÉS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

**(TRANSMISSION OF THE CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS
VIRUS THROUGH ARTIFICIAL INSEMINATION)**

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a transmissibilidade do Vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) através da Inseminação Artificial (IA), bem como avaliar a influência da carga viral nesta provável transmissão e verificar se o processo inflamatório causado pelo uso das esponjas intravaginais facilitariam a entrada do vírus no trato reprodutivo das fêmeas. Para tanto, foram utilizadas 30 cabras sem raça definida, negativas sorologicamente para o CAEV e um reprodutor Anglo-Nubiana também soronegativo, que teve o sêmen contaminado com vírus da cepa padrão CAEV-Cork, com dois títulos infectantes distintos, um 10^6 TCID₅₀/mL, para alta carga viral (ACV) e outro 10^2 TCID₅₀/mL, para baixa carga viral (BCV). As fêmeas tiveram o estro sincronizado utilizando-se dois protocolos, no G1(n=15) esponjas intravaginais e no G2 (n=15) implantes subcutâneos. Para as inseminações foram divididas em três grupos com 10 animais cada. Um grupo foi inseminado com ACV; um com BCV e o outro com o sêmen do mesmo reprodutor livre do vírus para controle negativo. O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$). Aos 30 dias pós-inseminação, a infecção experimental foi confirmada, quando 12 (60%) das 20 cabras inseminadas soroconverteram. Aos 60 dias, todas as fêmeas dos grupos ACV e BCV apresentaram anticorpos anti-CAEV. Não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos com relação as cargas virais, como também entre os que receberam esponjas intravaginais dos que receberam os implantes auriculares. As cabras do grupo controle permaneceram soronegativas durante todo experimento (12 meses). Nos parâmetros reprodutivos, não houve diferença entre o grupo controle e os grupos infectados. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o vírus pode ser transmitido pela inseminação artificial com sêmen infectado, a via venérea é uma potencial forma de infecção e que o vírus provavelmente não tem influência negativa na fertilidade das fêmeas.

Palavras-chave: CAEV, cabras, carga viral, inseminação artificial, transmissão

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the transmissibility of the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) by artificial insemination (AI), assess the influence of viral load in the transmission, and verify if the inflammatory process caused by the use of intravaginal sponges would facilitate the entry of the virus in the reproductive tract of females. To this end, 30 goats with no defined breed were used, all of them serologically negative for CAEV. A Nubian buck were used, also seronegative, who had its semen infected with the standard virus strain CAEV-Cork, with two different infective titles, $10^6\text{TCID}_{50}/\text{mL}$, considered high viral load, and $10^2\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ considered low viral load. The females were estrus synchronized using two protocols, intravaginal sponges in G1(n=15) and subcutaneous implants in G2 (n=15). For inseminations, goats were divided into three groups with 10 animals each. One group was inseminated with high viral load (HVL), other with a low viral load (LVL), and the latter with sperm from the same buck free of the virus, as a negative control. The experiment was conducted in accordance with the ethical principles of animal experimentation. Statistical analysis was performed using the chi-square test ($P<0.05$). At 30 days post-insemination, the experimental infection was confirmed, for 12 (60%) of 20 goats inoculated seroconverted, and at 60 days post-insemination, all females of HVL and LVL groups presented anti-CAEV antibodies. No statistical difference was found ($P>0,05$) between viral loads, and between the groups that received the intravaginal sponges or implants. The goats of the control group remained seronegative throughout the experiment (12 months). Reproductive parameters did not differ between the control and infected groups. Based on these results, we can conclude that the virus can be transmitted by artificial insemination with infected semen, and venereal route is a potential form of infection. The virus had no negative influence on fertility of females.

Key words: CAEV, goats, artificial insemination, transmission, viral load

INTRODUÇÃO

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma enfermidade infecciosa, causada por vírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae* e gênero *Lentivirus* que infecta caprinos em várias fases de desenvolvimento etário, independente de sexo e produção (LARA et al., 2005). Acarreta perdas econômicas consideráveis na caprinocultura, principalmente quando reprodutores e matrizes de alto valor genético são afetados, pois são retirados da reprodução, e muitas vezes oriundos de um programa de melhoramento genético, levando à perda de todo o potencial do animal para transmitir a sua genética para as gerações futuras (ANDRIOLI-PINHEIRO, 2001).

A principal forma de transmissão do vírus da CAE é a ingestão de colostro ou leite de fêmeas infectadas (CALLADO et al., 2001), embora outras vias sejam possíveis porém não comprovadas, como a transmissão materno-fetal e a sexual através do sêmen (ANDRIOLI, 2006b; ALI AL AHMAD et al., 2007). Pinheiro et al. (2001) evidencia que a difusão do CAEV entre plantéis se deva, principalmente, pela introdução de reprodutores infectados.

Para que a transmissão pelo sêmen seja comprovada, são necessárias as seguintes etapas: detecção do agente etiológico no sêmen de animais infectados; Inseminação com ejaculados contendo o vírus em fêmeas não infectadas, com subsequente comprovação da infecção das mesmas através de testes de diagnóstico (PETERSON et al., 2008). A primeira etapa já foi comprovada por Andrioli et al. (1999) onde observaram por PCR a presença do DNA pró-viral do CAEV no sêmen de caprinos naturalmente infectados. Embora os reprodutores apresentassem uma eliminação intermitente de DNA pró-viral do CAEV no sêmen (ANDRIOLI, et al., 2006b; PETERSON et al., 2008; PAULA et al., 2009), a comprovação da presença do vírus reforça a possibilidade da transmissão pela via sexual que representa um risco potencial de disseminação da enfermidade pela monta natural (ROWE et al., 1991) e principalmente pela Inseminação Artificial (IA), onde várias fêmeas podem ser inseminadas com um único ejaculado (ANDRIOLI et al., 2003).

Em humanos, a transmissão do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) pelo sêmen depende do estágio da doença, do estado imunológico ou nutricional do paciente e da associação com outras enfermidades (ALEXANDER, 1990). Assim como fatores virológicos, como a carga viral infectante. Além disso, a presença de inflamação da

mucosa e o tipo de relação sexual, interferem na disseminação do HIV (COHEN , 2002).

Em caprinos, pouco se conhece sobre esses fatores, havendo uma necessidade de incrementar essa linha de pesquisa para um melhor controle das enfermidades víricas, de caráter crônico, em que o aparecimento dos sintomas é tardio como é o caso da CAE (ANDRIOLI et al., 2003). Portanto, este estudo teve como objetivo verificar se a inseminação artificial com sêmen contaminado pode ser uma forma de transmissão do CAEV; bem como avaliar a influência da carga viral nesta provável transmissão e avaliar se o processo inflamatório causado pelo uso das esponjas intravaginais facilitariam a entrada do vírus no trato reprodutivo das fêmeas.

MATERIAL E MÉTODOS

PERÍODO E LOCAL

O estudo foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no Município de Sobral, na região Norte do Estado do Ceará. A Região está situada a 111 metros de altitude, 3°45'0,5" de latitude sul e 40°20'45,8" de longitude Oeste. O experimento compreendeu os meses de outubro de 2008 a outubro de 2009.

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Utilizou-se um reprodutor caprino da raça Anglo-Nubiana com seis anos de idade que teve a qualidade do sêmen comprovada por exame andrológico completo (CBRA, 1998) e 30 cabras Sem Raça Definida (SRD) com idades entre um e quatro anos. Os animais foram avaliados pré-experimento através dos testes de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e *Western Blot* (WB). Os mesmos não apresentaram anticorpos anti-CAEV sendo então selecionados pelo caráter negatividade.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2008).

SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

Antes das inseminações as fêmeas foram submetidas à sincronização hormonal do estro e foram divididas em dois grupos G1(n=15) e G2(n=15). No G1, utilizou-se esponjas intravaginais liberadoras de progesterona, com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP)², que foram inseridas na região cranial da vagina. O G2 recebeu outro método de aplicação de progesterona através de implantes subcutâneos

auriculares, com 1,0 mg de Norgestomet³, com o objetivo de verificar se o processo inflamatório causado pelas esponjas facilitariam o entrada do vírus no trato reprodutivo das fêmeas. Cada protocolo teve duração de 11 dias, sendo considerado o dia zero a introdução das fontes de progesterona. No dia 09 houve a aplicação intra-muscular de 50 µg de cloprostenol e 200 UI de gonadotropina coriônica eqüina (eCG) e no 11º dia foi retirada a fonte de progesterona (SALLES et al., 2002).

Após a retirada das fontes de progesterona, observou-se os sinais do estro nas fêmeas, a cada 12 horas exposta a presença do reprodutor sem contato físico entre macho e fêmeas.

INÓCULO VIRAL

O prepado do inóculo viral foi feito através de concentração por diálise (PLUMMER, 1978) utilizou-se vírus cepa padrão CAEV-Cork¹. O título foi calculado pelo método de Reed e Muench (1938) para obtenção dos títulos infectantes para alta carga viral (ACV) de 10⁶ TCID₅₀/mL e baixa carga viral (BCV) de 10² TCID₅₀/mL.

DILUIÇÃO DO SÊMEN

Como o vírus é mantido em Meio Essencial Mínimo (MEM) o mesmo foi testado como diluidor de sêmen quanto a seu potencial de manter a viabilidade dos espermatozoides. Desta forma, o MEM foi testado pré-experimento com diferentes concentrações de soro fetal bovino (0%, 2% e 5%) e diferentes fontes de energia (glicose ou frutose).

Após cada diluição foi realizado o teste de termoresistência do sêmen aos 5, 60, 90 e 120 minutos pós coleta, sendo observado que os espermatozoides apresentaram melhores resultados, quanto ao vigor e motilidade, em MEM com 2% de soro fetal bovino e glicose 0,01molar como fonte de energia.

¹ Laboratoire Associé de Recherches sur les Petits Ruminants – INRA – ENVL – France

² Progesteron – SYNTEX S.A. - Argentina

³ Crestar - Intervet - Brasil

Antes das inseminações, o sêmen do reprodutor soronegativo para o CAEV foi coletado através de vagina artificial, em tubo estéril (Falcon 15 mL) e em seguida foi levado ao laboratório de tecnologia do sêmen da Embrapa Caprinos e Ovinos. Após comprovação da qualidade do sêmen através da avaliação da motilidade e vigor dos espermatozóides, o mesmo foi separado em três partes iguais e adicionado o diluidor, sendo que, uma parte não continha o CAEV para controle negativo (CN); a outra o diluidor com título 10^6 TCID₅₀/mL e a terceira parte com título 10^2 TCID₅₀/mL. Em seguida o sêmen foi envasado em palhetas de 0,50 mL e colocadas em isopor com água a 37°C para inseminação a fresco.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

As fêmeas do G1 (n=15) tratadas com esponjas intravaginais foram subdivididas em três grupos (G1.1, G1.2 e G1.3) com cinco animais cada. Da mesma forma foi realizada no grupo G2, sincronizadas com implantes subcutâneos auriculares (G2.1, G2.2 e G2.3).

Todas as fêmeas foram inseminadas por via transcervical em tempo fixo às 32 h e 48 h após retirada das fontes de progesterona, incluindo aquelas que não apresentaram sinais de estro. As fêmeas dos grupos (G1.1 e G2.1) foram inseminadas com o sêmen não contaminado pelo vírus, correspondendo ao grupo controle negativo (CN); os grupos (G1.2 e G2.2) receberam o sêmen contaminado com baixa carga viral passando a ser o grupo BCV e os grupos (G1.3 e G2.3) receberam sêmen contaminado com alta carga viral (ACV).

No momento das IAs, as fêmeas foram devidamente contidas, utilizando-se espéculo vaginal (bico de pato), fonte de luz e aplicador de sêmen de 0,5 mL. A cérvix foi localizada e o sêmen aplicado o mais profundamente possível. Neste momento, foi observada a presença ou não de inflamação da mucosa, que era caracterizada por vermelhidão e/ou presença de muco com odor fétido e a ocorrência de sangramento durante as inseminações. Cada fêmea recebeu duas doses do sêmen com 0,50 mL cada, as 32 e 48 horas da retirada das fontes de progesterona respectivamente, totalizando 2 mL.

MANEJO PÓS-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Após as inseminações os grupos foram mantidos em piquetes separados e isolados entre si, por cerca dupla mantendo uma distância de 1,5 m entre os piquetes (Figura 1). Esta distância foi essencial para não ocorrer nenhum contato físico entre os animais experimentais e nem com outros animais do entorno. Os piquetes tinham 12 hectares cada e estavam localizados em uma área de caatinga raleada com aprisco. As fêmeas foram mantidas em sistema semi-extensivo de criação, alimentadas com ração balanceada, com 72% milho, 25% soja e 3% de sal mineral; capim oferecido no coxo na época seca e água *ad libitum*.

Durante todo o experimento foram acompanhadas pelo teste de diagnóstico WB e todas as medidas profiláticas foram adotadas para impedir a transmissão entre os grupos experimentais.



Foto: Kelma Costa de Souza

Figura 1. Cerca dupla para separação dos piquetes dos animais experimentais

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 60 dias pós inseminação por meio de exames ultrassonográficos com equipamento *Biosound-Esoat*[®], modelo Falco, utilizando o transdutor transretal de 5,0 Mhz.

MENSURAÇÃO DOS ÍNDICES REPRODUTIVOS

Para mensurar os índices reprodutivos foram utilizadas as fórmulas a seguir segundo Andrioli (2006):

$$\text{Taxa de gestação: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de cabras prenhes}}{\text{n}^\circ \text{ de cabras expostas}} \times 100$$

$$\text{Taxa de parição: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de cabras paridas}}{\text{n}^\circ \text{ de cabras expostas}} \times 100$$

$$\text{Prolificidade: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de crias nascidas}}{\text{n}^\circ \text{ de cabras paridas}}$$

COLETAS DE SANGUE

As coletas de sangue foram realizadas mensalmente até quatro meses após as inseminações e, posteriormente, a cada 60 dias até os 12 meses do desafio (inseminações). As amostras foram obtidas por punção da veia jugular utilizando-se sistema vacutainer[®], com tubos de 10 mL sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 1500g por 15 minutos, para a separação do soro. Estes foram armazenados em tubos eppendorf[®] devidamente identificados em duplicata e estocados em freezer a -20°C até a análise.

PROVA SOROLÓGICA

O teste de diagnóstico utilizado foi *Western Blot* (WB) realizado mensalmente até quatro meses das inseminações, a fim de detectar o momento mais aproximado da soroconversão. Após esta o teste passou a ser realizado a cada 60 dias até 12 meses do desafio.

Para realização do WB utilizou-se metodologia empregada por Rodrigues et al. (2009) adaptada de Pinheiro (2001). O antígeno utilizado foi produzido no Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, contendo a proteína p28 do CAEV (PINHEIRO et al., 2006). A concentração obtida no antígeno foi de 4,25 mg/mL pelo método de Bradford (1976).

Foi utilizada uma quantidade de 13 µL de antígeno (55,3 µg de proteína) por gel (SDS-PAGE) a 12,5%. A corrida foi em aparelho BIO-RAD modelo Power Pac HC, a programação inicial foi de 300 Watts (W), 1,00 Ampères (A) e 170 volts (V) por aproximadamente 60 minutos.

As proteínas, assim separadas, foram transferidas do gel para a Membrana de Nitrocelulose (MN) (PROTAN BA 85 is stuck 7,5 x 8,5 cm) com porosidade de 0,45 µm, a programação inicial da transferência foi de 300 W, com corrente de 1,00 A e voltagem de 100 V por 60 minutos. Após a transferência a MN foi colocada em recipiente contendo corante Ponceau's ficando sob agitação e seguidamente lavada com água destilada, até a visualização das bandas de proteína. Logo após, a MN foi colocada em solução de bloqueio PBS (Na_2HPO_4 3,54 g e NaH_2PO_4 1,2 g) Tween 0,3% com soro negativo por 60 minutos e lavada com solução de PBS-Tween 0,05% por três vezes cinco minutos cada lavagem. Posteriormente a MN foi cortada em tiras, devidamente identificadas e divididas em tubos de ensaio de 5 mL com solução de PBS 1X. A estes tubos foram adicionados os soro dos animais e os controles positivo e negativo numa diluição de 1:50 e incubados por 30 minutos. Em seguida, realizaram-se três lavagens com PBS-Tween 0,05% cinco minutos cada lavagem. Foi colocado o conjugado Sigma® (A 5420), IgG anti-cabra conjugado com peroxidase, diluído em PBS 1X (1:20000) por 60 minutos. As tiras foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05% e duas vezes com PBS 1X, cinco minutos cada. Em seguida foram retiradas dos tubos de ensaio e colocadas em refratário, 10 x 8 cm. A essas foram adicionados os substratos

cromogênicos, 4-Cloro-1-naphthol Sigma® (C-6788) e 3,3' Diaminobenzidine (DAB) Sigma® (D5637-5G), adicionados de Peróxido de Hidrogênio de H₂O₂ a 30% Fluko Analytical® (95313). A revelação das bandas de proteína ocorreu ao abrigo da luz, entre 30 a 60 segundos e a reação foi cessada com adição de água destilada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) com valor estabelecido de ($P < 0,05$) e correção de Yates, utilizando-se o programa estatístico EPI-INFO versão 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A infecção experimental foi confirmada aos 30 dias após as inseminações com o sêmen contaminado pelo CAEV-Cork, quando foi verificada a soroconversão de 12 (60%) das 20 cabras inoculadas, sendo que dez (100%) pertenciam ao grupo ACV e duas (20%) ao grupo BCV. Com 60 dias de inoculadas todas as cabras dos grupos que receberam o sêmen contaminado apresentaram anticorpos anti-CAEV no WB, permanecendo neste quadro até os 360 dias após as IAs. Não foi observada diferença estatística ($P>0,05$) entre os grupos, embora a soroconversão tenha sido detectada mais precocemente no grupo de fêmeas inseminadas com título de 10^6 TCID₅₀/mL, ou seja, ACV. Nenhuma cabra do grupo controle apresentou anticorpos anti-CAEV no teste, durante todo o experimento. Na Figura 1 pode ser observada resultados encontrados no WB.

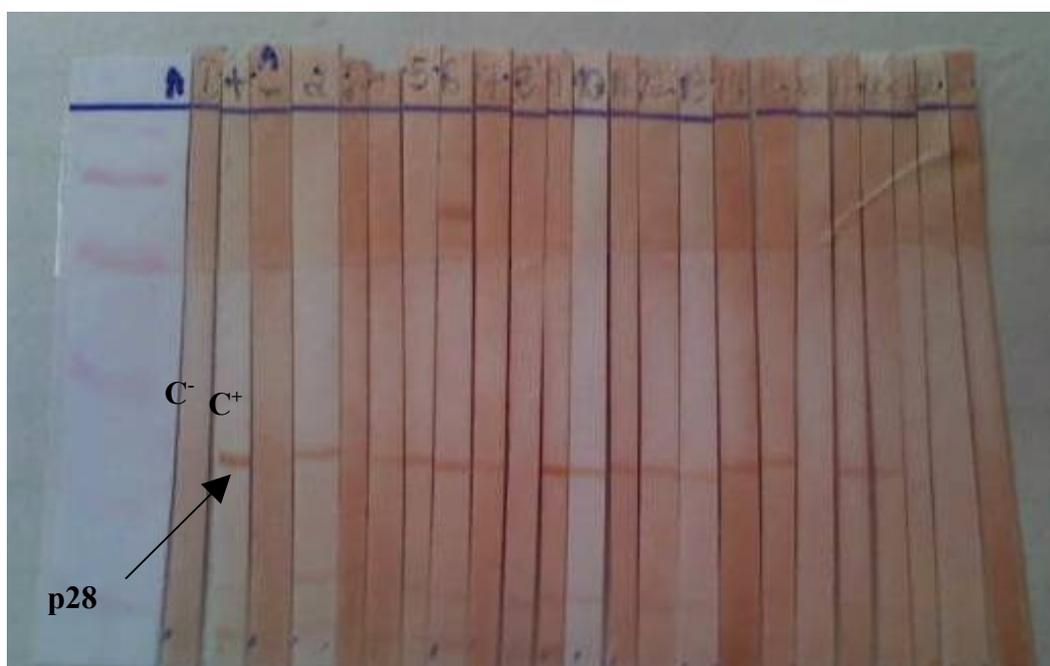


Figura 2. Resultado do *Western Blot*, observar que a coloração mais evidente na altura da proteína p28 significam amostras positivas.

A comprovação da transmissão do CAEV por IA corrobora com trabalhos realizados por Andrioli et al. (1999; 2006a), Cruz et al (2009), Paula et al.(2009) e Ricarte (2009), aos quais sugeriram que o sêmen de caprinos infectados contém o vírus e portanto poderia transmitir o CAEV. Igualmente Andrioli et al. (2003) enfatizaram o risco de disseminação da infecção pela inseminação artificial, suspeita essa que pôde ser constatada neste estudo, quando se comprovou a transmissão do CAEV pelo sêmen

contaminado experimentalmente, e ainda, que um único ejaculado pode disseminar o vírus em até 100% das fêmeas inseminadas artificialmente.

Rowe et al. (1991) observaram que algumas cabras soroconverteram entre 100 e 140 dias após terem sido submetidas a monta natural com machos soropositivos, suspeitando que a transmissão ocorreu pela cópula. Os autores provavelmente não afirmaram essa via de transmissão pelo fato das fêmeas terem tido contato direto com o macho infectado. Diferente dos resultados deste estudo, em que o sêmen contaminado foi introduzido diretamente no trato reprodutivo das fêmeas por IA como sugeriram Peterson et al. (2008), não existindo contato algum entre as cabras com o macho, que para maior segurança do estudo era comprovadamente soronegativo para o CAEV. Assim, a transmissão sexual da CAEV, reforça a importância sanitária dos reprodutores e da necessidade de serem regularmente testados, para utilização destes como doadores de sêmen em programas de inseminação artificial e seleção genética (ALI AL HAMAD et al., 2007).

Outros lentivírus também responsáveis por infecções em bovinos, felinos, primatas e humanos, foram igualmente detectados no sêmen, apresentando transmissão potencial (MERMIN et al., 1991; JORDAN et al., 1995; NASH et al., 1995). O vírus da imunodeficiência felina (FIV) teve a transmissão pela via sexual comprovada quando Holly et al. (1998) inseminaram seis fêmeas com sêmen fresco de machos infectados por FIV e três delas soroconverteram.

No caso do lentivírus humano, a via sexual é a maior responsável pela disseminação do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), vírus responsável pela AIDS. Na África, por exemplo, 60% das novas infecções são em mulheres que mantiveram relação sexual com homens HIV positivos (SWAMINATHAN, 2009).

Estudos sobre a influência da carga viral na transmissão do CAEV, especialmente pela via sexual ainda são incipientes. Neste experimento, embora todas as cabras tenham se contaminado independente da carga viral, as que receberam maior título soroconverteram mais precocemente, embora na literatura não tenha dados sobre as quantidades de inócuos virais que estão presentes no sêmen e qual é a carga viral capaz de transmitir a infecção. Alguns trabalhos, evidenciam fatores que podem influenciar a presença do CAEV no sêmen como o estresse ocasionado pelo aumento da atividade sexual na estação reprodutiva e em épocas de alta temperatura ambiental (ANDRIOLI et al., 2006a; PETERSON et al., 2008, PAULA et al. 2009). Andrioli et al., (2006a) observaram em machos infectados com CAEV que a porcentagem de sêmen

positivos ao PCR antes e após injúria testicular foi de 21,4% e 50%, respectivamente, demonstrando que o processo inflamatório aumenta o fluxo de células de defesa como também aumentam a carga viral.

Alguns autores avaliando o perfil de anticorpos anti-CAEV no sangue por IDGA e do DNA pró-viral do CAEV no sangue e sêmen por PCR, de reprodutores infectados, observaram que não existe correlação entre eles (ALI AL HAMAD et al. 2007; PAULA et al. 2009), e que tanto no sangue como no sêmen a presença do vírus é intermitente (PAULA et al., 2009). Além disso, Paula et al.(2009) observaram que o CAEV foi detectado no sêmen (PCR) de reprodutores infectados experimentalmente antes do diagnóstico por IDGA demonstrando que machos com infecção recente representam importantes fontes de infecção e que a ausência do vírus no sangue não exclui a excreção do agente patogênico no plasma seminal, nem uma possível transmissão.

Avaliando se as esponjas intravaginais influenciariam na infecção das fêmeas, observou-se que aos 30 dias das IAs, 50% das cabras sincronizadas com as esponjas intravaginais e que receberam ACV soroconverteram. Das sincronizadas com implantes auriculares no mesmo período soroconverteram cinco na ACV e duas na BCV num total de 70% dos animais. Com 60 dias 100% soroconverteram independente do protocolo de sincronização e das cargas virais, não havendo diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$). Os resultados estão sumarizados na Tabela 1. Com o lentivírus humano, Lazzarin et al. (1991) sugerem que o uso de dispositivos intrauterinos seja potencialmente associado a uma maior chance da transmissão sexual do HIV em mulheres.

No presente estudo, não foi observada inflamação no canal vaginal das cabras na hora das inseminações e provavelmente o que possa ter contribuído para a infecção das fêmeas inoculadas, deva ter sido o fato de a população de células responsáveis por protegerem a vagina serem comparáveis àquelas encontradas nas superfícies de mucosas expostas à antígenos ambientais, como o trato gastrointestinal e as vias respiratórias superiores (HAFEZ; HAFEZ, 2004), que são comprovadas vias de infecção do CAEV.

Tabela 1 – Porcentagem de fêmeas positivas nos dois protocolos Esponjas X Implantes com as diferentes cargas virais no período de 30 e 60 dias das IAs com o sêmen contaminado.

	30 dias n (%)			60 dias n (%)		
	Esponjas intravaginais	Implantes Auriculares	Total	Esponjas intravaginais	Implantes Auriculares	Total
ACV	5/5 (100%)	5/5 (100%)	10/10(100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	10/10 (100%)
BCV	0/5 (0%)	2/5 (40%)	2/10 (20%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	10/10 (100%)

BCV = baixa carga viral título 10^2 TCID₅₀/mL

Quanto aos aspectos reprodutivos das 30 fêmeas submetidas ao tratamento de sincronização do estro, no G1 11 cabras (73,3%) apresentaram estro entre 24 e 48 horas da retirada das fontes de progesterona, porém, em quatro delas (26,7%) não foi observado nenhum sinal de estro. No G2, 12 cabras (80%) apresentaram estro e em três delas (20%) não foi observado nenhum sinal característico. Sendo que a porcentagem de estro mostrou eficiência dos dois procedimentos.

Como o diagnóstico de gestação foi realizado aos 60 dias, quando todas as cabras inseminadas com o sêmen contaminado já haviam soroconvertido, os resultados foram comparados entre grupo controle e inoculados. As taxas de gestação foram de 10% (1/10) no grupo controle, e 35% (7/20) nos inoculados. Apesar de ter havido resultados superiores no grupo das positivas, não foi observada diferença ($P \geq 0,05$), possivelmente pelo pequeno número de animais utilizados. Os dados gerais são considerados baixos comparados a outros estudos com sêmen fresco, talvez pelo fato de a inseminação ter sido em tempo fixo, já que, a literatura é um pouco conflitante acerca do assunto. Machado e Simplicio (2001) mostraram que inseminações feitas precocemente ou tardiamente levaram à redução na taxa de fertilidade. Baril et al. (1992) recomendaram que a inseminação seja realizada entre 43 e 45 horas após a remoção da fonte de progesterona; já Ritar et al. (1990) encontraram os melhores resultados quando as inseminações foram realizadas 55 horas depois da retirada.

As taxas de parição foram de 10% para o grupo controle e 20% para inoculadas. Entretanto, ocorreram dois abortos por volta de 70 dias de gestação no grupo das positivas, ressaltando que em um desses abortos foram observados três fetos, o que provavelmente contribuiu para o ocorrido. No tocante a prolificidade, os resultados encontrados foram de 1,0 e 1,4 para soronegativas e soropositivas, respectivamente. Os resultados gerais estão na Tabela 2. Outro fator observado foi que o grupo inoculado mostrou uma maior tendência a partos duplos. Brito (2009) realizou duas avaliações reprodutivas em cabras soronegativas e soropositivas, as cabras infectadas apresentaram resultados reprodutivos superiores, na primeira avaliação em relação às fêmeas soronegativas. A mesma autora observou que as cabras soropositivas apresentaram partos, com mais de uma cria significativamente mais elevadas que as do grupo soronegativo. Resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho. Desta

forma, suspeita-se que os parâmetros reprodutivos, apresentam alterações somente com o avançar da infecção e não pela ação direta do vírus, mas possivelmente pelo estado de desnutrição que as fêmeas possam atingir, pois os nutrientes absorvidos dos alimentos é utilizado pelo animal para sua manutenção e não para a reprodução.

Tabela 2 - Taxas de gestação e parição, índice de prolificidade em cabras soronegativas e soropositivas para o CAEV.

Grupos			
Parâmetro	Infectados	Controle	Total
Taxa de gestação %	35,0 (7/20)	10,0 (1/10)	26,7 (8/30)
Taxa de parição %	25,0 (5/20)	10,0 (1/10)	20,0 (6/30)
Prolificidade	1,4	1,0	1,3

CONCLUSÕES

Com os resultados deste estudo comprovou-se a transmissão do CAEV pelo sêmen contaminado experimentalmente e constatou-se que um único ejaculado de um reprodutor infectado pode disseminar o vírus em até 100% das fêmeas inseminadas artificialmente.

A dose/carga viral utilizada, neste experimento foi capaz de infectar as fêmeas, sendo que a soroconversão tendeu a ser mais rápida nas cabras que receberam maior carga viral.

A transmissão de CAEV não é influenciada, pelo método de tratamento de sincronização do estro e indução da ovulação.

O MEM com 2% de soro fetal bovino e glicose pode ser utilizado como diluidor de sêmen caprino e para contaminação de sêmen em experimentos sobre transmissão de patogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, N. J. Sexual transmission of human immunodeficiency virus: virus entry into the male and female genital tract. **Fertility and Sterility**, v. 54, p. 1-18, 1990.

ALI AL AHMAD, M. Z. FIENI, F. PELLERIN, J. L. GUIGUEN, F. CHEREL, Y. CHATAGNON, G. BOUZAR, A. B. CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, p. 473-480, 2007.

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

ANDRIOLI-PINHEIRO. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R. **Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Sobral, Comunicado técnico. EMBRAPA-CNPC, n. 50, 23 p. 2003.

ANDRIOLI, A. Manejo reprodutivo. In: CHAPAVAL, L.; OLIVEIRA, A. A. F.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A.; DE ARAÚJO, A. M.; OLIVINDO, C. S. **Manual do produtor de cabras leiteiras**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2006. Cap. 5, p. 96 -126.

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**, Brasília, v. 41, p. 1313-1319, 2006a.

BARIL, G.; REMY, B.; VALLET, J. C.; BECKERS, J. F. Effect of repeated use of progestagen-PMSG treatment for estrus control in dairy goats of breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 27, n. 3, p. 161-168, 1992.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 107 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.

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

CBRA – Manual para Exame Andrológico e Avaliação de sêmen animal. 2ª Ed. Belo Horizonte. 1998.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php>>. Acesso em: 08 set 2008.

COHEN, M. S. HAART and Prevention of HIV Transmission. Conference Reports. Medscape HIV/AIDS, v.8, n.2, 2002 ©2002 Medscape. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/437545>. Acesso em: 27 jan 2010.

CRUZ, 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. 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.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HOLLY, L.; JORDAN, J.O. GAYLE HOWARD, JOSEPH G. BUCCI, JENNIFER L. BUTTERWORTH, ROBERT ENGLISH, SUZANNE KENNEDY-STOSKOPF, MARY B. TOMPKINS AND WAYNE A. TOMPKINS. Horizontal transmission of feline immunodeficiency virus with semen from seropositive cats. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 41, p. 341-357, 1998.

JORDAN, H. L.; HOWARD, J.; TOMPKINS, W.A.; KENNEDYSTOSKOPF, S. Detection of feline immunodeficiency virus in semen from seropositive domestic cats (*Felis catus*). **Journal of Virology**, v. 69, p.7328-7333, 1995

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 553 - 555, 2005.

LAZZARIN, A.; SARACCO, A. MUSICCO, A.; NICOLOSI, A. Man-to-woman sexual transmission of the human immunodeficiency virus. Risk factors related to sexual behavior, man's infectiousness, and woman's susceptibility. Italian Study Group on HIV Heterosexual Transmission. **Archives of Internal Medicine**, v. 151, n. 12, p. 2411- 2416, 1991.

MACHADO, R.; SIMPLICIO, A. A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 171-178, 2001.

[MERMIN, J. H.](#); [HOLODNIY, M.](#); [KATZENSTEIN, D. A.](#); [MERIGAN, T. C.](#) Detection of human immunodeficiency virus DNA and RNA in semen by the polymerase chain reaction. **Journal Infectious Diseases**, v. 164, n. 4, p.769-72, 1991.

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.

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. 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, p. 27-33, 2009.

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

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.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência da infecção pelo vírus da artrite encefalite no Estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 3, p. 449-454, 2001.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEA, A. M. G.; ARAUJO, S. C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de *dot-blot* para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite-Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 101, p. 51-56, 2006.

PLUMMER, D. T. **An Introduction to Practical Biochemistry**, 2 ed; McGraw-Hill: London, 1979, 362 p.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent end points. **American Journal Higiene**, v. 27, p. 493-497, 1938.

RICARTE, A. R. F. **Avaliação da susceptibilidade de gametas e embriões caprinos ao vírus da artrite encefalite caprina**. 2009. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza 2009.

RITAR, A. J.; O'MAY, P. J.; BALL, P.D. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. **Reproduction, Fertility and Development, Collingood**, v. 2, n. 3, p. 377-384, 1990.

RODRIGUES, A. S.; BRITO, R. L. L.; SANTOS, V. W. S.; DIAS, R. P.; BRITO, I. F.; ANRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Comparação de dois testes sorológicos na evolução natural de caprinos leiteiros com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina- dados preliminares. In: SINCORTE, 4, 2009, João Pessoa, **Anais...** João Pessoa, 2009.

ROWE, J. D.; ESAST, N. E.; FRANTI, C. E.; THURMOND, M. C.; PEDERSON, 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, n. 12, p. 2396-2430, 1991.

SALLES, H.O.; ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; MEDEIROS, J.N.; MACHADO, O. M. Manual de transferência de embriões em caprinos. Sobral: Embrapa Caprinos, 2002. 64 p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 40).

SWAMINATHAN, N. Sêmen torna o HIV mais potente. Disponível www2.uol.com.br/.../semen_torna_o_hiv_mais_potente.html Acesso em: 21 Dez 2009.

CAPÍTULO 3

MONITORAMENTO SOROLÓGICO E CLÍNICO DE CABRAS INFECTADAS EXPERIMENTALMENTE PELO VÍRUS DA ARTRITE-ENCEFALITE CAPRINA

**(CLINICAL AND SEROLOGICAL MONITORING OF GOATS
EXPERIMENTALLY INFECTED BY CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS
VIRUS)
RESUMO**

O objetivo do presente trabalho foi verificar qual teste de diagnóstico IDGA ou WB, detectaria mais precocemente a soroconversão de cabras infectadas experimentalmente pelo Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) via inseminação artificial e comparar este comportamento sorológico com os sinais clínicos da doença. Foram utilizadas 30 cabras sem raça definida, sendo 10 inseminadas com sêmen livre do CAEV como controle negativo e 20 inseminadas com sêmen contaminado com o vírus cepa padrão CAEV-Cork. Em seguida, as cabras foram acompanhadas sorologicamente e clinicamente por um ano. O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste do qui-quadrado ($P < 0,05$). Aos 30 dias pós-inseminação, foram detectadas as primeiras soroconversões, sendo que, das 20 cabras inoculadas, em duas foram detectados anticorpos para o vírus da CAE utilizando a técnica de IDGA e 12 pela técnica *Western Blot*. Após um ano das IAs, todas as cabras inoculadas apresentaram reação de anticorpos aos antígenos do CAEV nos dois testes, enquanto que as 10 cabras do grupo controle permaneceram soronegativas durante todo o experimento. O IDGA apresentou, no período estudado, oito resultados falso-negativos dentre 60 testes (13,3%), enquanto que com o WB houve apenas um falso-negativo entre 132 testes realizados (0,76%) ($P < 0,001$). Quanto à sintomatologia clínica da CAE observou-se que apenas duas (10%) das fêmeas infectadas apresentaram ligeiro aumento do IAC, sendo consideradas clinicamente suspeitas de problemas articulares. Concluiu-se que, devido a CAE permanecer por longo período de forma assintomática, e o teste de IDGA não detectar precocemente os animais infectados, e ainda, da grande ocorrência de resultados falso-negativos, deve-se utilizar testes de diagnóstico mais sensíveis, como o WB, periodicamente, para controlar a CAE nos rebanhos nacionais.

Palavras chave: cabras, CAE, IDGA, sintomatologia clínica, *Western Blot*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate which diagnostic test, agar gel immunodiffusion (AGID) or Western Blot (WB), would detect early seroconversion of goats experimentally infected by Caprine Arthritis-Encephalitis Virus (CAEV) via artificial insemination and compare the serological pattern with the clinical signs of disease. Thirty goats were used, with no defined breed, inseminated with semen contaminated with the standard virus strain CAEV-Cork. The goats were then serologically and clinically followed for a year. The experiment was conducted in accordance to the ethical principles of animal experimentation. Statistical analysis was performed using the chi-square test ($P < 0.05$). At 30 days after insemination, there were found the first seroconversions. In two, out of 20 goats inoculated, antibodies were detected for the CAE virus using the technique of AGID, and 12 by a Western Blot. After a year of the AIs, all inoculated goats showed reaction of antibodies to antigens of CAEV in both tests, indicating that they were infected. All the 10 goats in the control group remained seronegative throughout the experiment. The AGID presented, during the study period, eight false-negative results among 60 tests (13.3%), while the WB showed only one false-negative among 132 tests performed (0.76%) ($P < 0.001$). As the clinical symptoms of CAE noted that only two (10%) of the infected females showed a slight increase in the ACT articular index clinical, are considered clinically suspected joint problems It was concluded that due to CAE remains asymptomatic for long periods, and the AGID test does not detect early infected animals, and the high occurrence of false-negative, there should be used more sensitive diagnostic tests, such as WB, periodically, to monitor the CAE in the national herd.

Key words: CAE, AGID, clinical symptoms, goats, Western Blot

INTRODUÇÃO

O vírus da CAE causa uma infecção caracterizada por quatro quadros clínicos principais: artrite, encefalite, mamite e pneumonia que podem ocorrer de forma isolada ou simultânea. Embora a frequência e gravidade da manifestação clínica variem, as lesões mantêm suas características (NARAYAN et al., 1980). A sintomatologia mais comum e que usualmente se manifesta inicialmente é a artrite, mas muitas vezes os animais soropositivos não apresentam sintomatologia clínica (WILKERSON et al., 1995).

A ocorrência de animais com artrite no rebanho serve como um alerta da possibilidade do CAEV estar presente, porém como a enfermidade pode ser assintomática os exames laboratoriais são importantes e necessários para identificar os animais infectados. O diagnóstico laboratorial é relevante nos casos em que há ausência de manifestações clínicas, como, também, é utilizado para o diagnóstico confirmatório da doença (OIE, 2005).

O diagnóstico da CAE pode ser feito por exames diretos e/ou indiretos. Dentre os métodos diretos pode-se citar: o isolamento viral, a microscopia eletrônica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa (RT-PCR). Os métodos indiretos de diagnóstico detectam a presença de anticorpos por técnicas sorológicas como imunodifusão em gel de agarose, imunofluorescência indireta, ELISA, Dot-Blot e *Western blot* (WB) (PINHEIRO et al., 2001).

O principal teste sorológico empregado para a detecção de anticorpos anti CAEV é o IDGA, recomendado pela OIE, por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas. Já o WB é utilizado geralmente em pesquisas e em alguns casos para confirmação de animais suspeitos (PINHEIRO, 2001).

Quando há suspeita da infecção, a confirmação pode ser conduzida pela combinação da avaliação clínica e avaliação sorológica dos animais, o que é fundamental para o diagnóstico. Embora o estabelecimento da condição de soro reagente identifique os animais portadores, segundo De Martini et al. (1999), muitos

fatores influenciam no diagnóstico sorológico dos animais infectados, como a variação no tempo de início da infecção, as diferenças dos hospedeiros com relação à resposta imunológica, dentre outros.

Objetivou-se com presente trabalho verificar qual teste de diagnóstico IDGA ou WB, detectaria mais precocemente a soroconversão das cabras e comparar este comportamento sorológico com os sinais clínicos da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

PERÍODO E LOCAL

O estudo foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no Município de Sobral, na região Norte do Estado do Ceará. A Região está situada a 111 metros de altitude, 3°45'0,5" de latitude sul e 40°20'45,8" de longitude Oeste. O experimento compreendeu os meses de outubro de 2008 a outubro de 2009.

ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizadas 20 cabras Sem Raça Definida (SRD) com idades entre um e quatro anos, infectadas experimentalmente pelo CAEV através de IA e 10 não infectadas como controle negativo.

As cabras foram divididas em três grupos de 10 animais cada. Esses grupos foram mantidos separados e isolados, por cerca dupla com distância de 1,5 m entre os piquetes. Esta distância foi essencial para não ocorrer nenhum contato físico entre os animais experimentais e nem com outros animais do entorno. Os piquetes tinham 12 hectares cada e estavam localizados em uma área de caatinga raleada. As fêmeas foram mantidas em sistema semi-extensivo de criação, alimentadas com ração balanceada, contendo 72% milho, 25% soja e 3% de sal mineral; capim oferecido no coxo na época seca e água *ad libitum*.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2008).

EXAME CLÍNICO

O exame clínico foi realizado mensalmente segundo Pugh (2004). Em todos os grupos foram avaliados a frequência cardíaca (FC) e a frequência respiratória (FR) com auxílio de estetoscópio sobre a região torácica, mensurando os batimentos/movimentos por minuto, para determinação da FC (bat/min) e FR (mov/min). A temperatura retal (°C) foi aferida com termômetro clínico introduzido diretamente no reto do animal de forma que o bulbo ficasse em contato com a mucosa por dois minutos. Foram realizadas ainda palpação dos linfonodos superficiais e observação da coloração das mucosas oculares, como também auscultados a presença de movimentos ruminais e mensurado o índice articular clínico (IAC) com fita métrica, segundo Pinheiro et al. (2005), que é obtido pela diferença entre a circunferência das articulações carpo-metacarpiana a metade do diâmetro do metacarpo direito e esquerdo (Figura 1), foi verificada conjuntamente a ocorrência de claudicação e dor.



Fotos: Kelma Costa de Souza

Figura 1. Índice Articular Clínico, a) Mensuração do carpo b) Mensuração do metacarpo

COLETAS DE SANGUE

As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular utilizando-se sistema vacutainer[®], com tubos de 10 mL sem anticoagulante. As coletas foram

realizadas no momento zero (pré-experimento) e repetiu-se aos 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após as inseminações. As amostras foram centrifugadas a 1500g por 15 minutos, para a separação do soro. Estes foram armazenados em tubos eppendorf® devidamente identificados em duplicata e estocados em freezer a -20°C para serem utilizados nos testes de IDGA e WB.

Em tubos de 5 mL com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi coletado o sangue para o hemograma completo, antes e aos 13 meses do período experimental. Para a realização de análise hematológica foi utilizado Aparelho MINDRAY modelo BC – 28000vet – Auto Hematology Analyser. Para o diferencial de leucócitos foram realizados esfregaços sanguíneos e as lâminas, coradas com kit Newprov, Instant-Prov - corantes para diferencial rápida em hematologia.

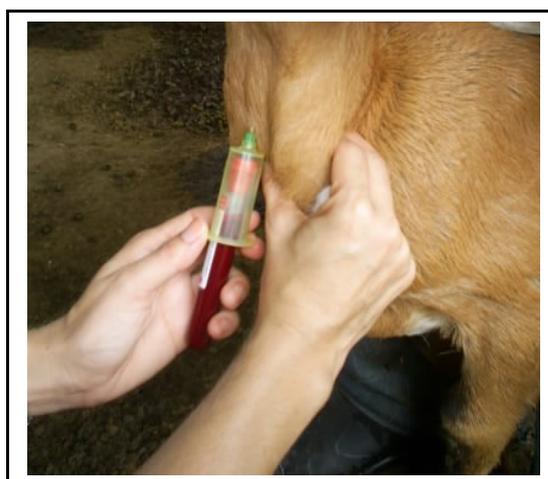


Foto: Kelma Costa de Souza

Figura 2: Coleta de sangue por punção da veia jugular

PROVAS SOROLÓGICAS

Os testes de diagnóstico utilizados foram Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e *Western Blot* (WB) realizados pré-experimento e a cada 30 dias, até que fosse detectada soroconversão, e a partir desta a cada 60 dias até 12 meses após as inseminações. O antígeno utilizado foi produzido no Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, contendo a proteína p28 da CAEV (PINHEIRO et al., 2006).

Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

O IDGA foi realizado com a microtécnica descrita por Gouveia et al. (2000) utilizando 100 mL de PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,20g; NaH_2PO_4 - 0,22g e NaCl - 8,50g), 1g de agarose e 6g de NaCl para composição do gel, que foi distribuída em lâminas de 26 x 76 mm de diâmetro, na proporção de 4,6 mL por lâmina. Após a solidificação do gel estas foram estocadas em refrigerador por 24 horas, quando foi procedida a perfuração do gel para a obtenção de dois conjuntos hexagonais por lâmina, com sete orifícios, cada.

Após a numeração dos orifícios, foi feita a distribuição de 30 μL do antígeno no orifício central, igual quantidade de soro padrão positivo e de soro teste nos seus respectivos orifícios (Figura 3.).

As lâminas foram mantidas à temperatura de 25°C, por 48 horas, quando foi feita a leitura 48 - 72 horas após a realização do teste, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo considerada definitiva a última leitura.

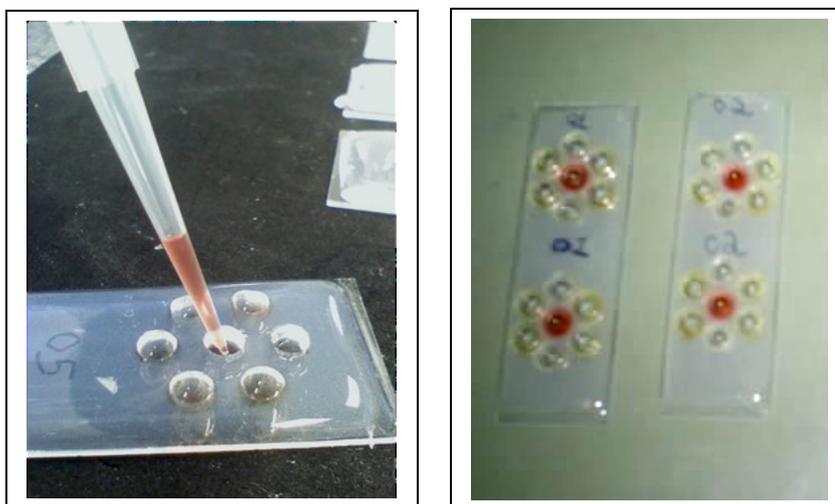


Figura 3. a) Colocação do antígeno no orifício central da lâmina b) lâmina com os orifícios preenchidos pelas amostras, soro reagente e antígeno

Fotos: Kelma Costa de Souza

Western blot (WB)

Para realização do WB utilizou-se a metodologia empregada por Rodrigues et al. (2009) adaptada de Pinheiro (2001). O antígeno utilizado foi produzido no Laboratório de Virologia da Embrapa Caprinos e Ovinos, contendo a proteína p28 do CAEV (PINHEIRO et al., 2006). A concentração obtida no antígeno foi de 4,25 mg/mL pelo método de Bradford (1976).

Foi utilizada uma quantidade de 13 µL de antígeno (55,3 µg de proteína) por gel (SDS-PAGE) a 12,5%. A corrida foi em aparelho BIO-RAD modelo Power Pac HC, a programação inicial foi de 300 Watts (W), 1,00 Ampères (A) e 170 volts (V) por aproximadamente 60 minutos.

As proteínas, assim separadas, foram transferidas do gel para a Membrana de Nitrocelulose (MN) (PROTAN BA 85 is stuck 7,5x 8,5 cm) com porosidade de 0,45 µm, a programação inicial da transferência foi de 300 W, com corrente de 1,00 A e voltagem de 100 V por 60 minutos. Após a transferência a MN foi colocada em recipiente contendo corante Ponceau's ficando sob agitação e seguidamente lavada com água destilada, até a visualização das bandas de proteína. Logo após, a MN foi colocada em solução de bloqueio PBS (Na_2HPO_4 3,54 g e NaH_2PO_4 1,2 g) Tween 0,3% com soro negativo por 60 minutos e lavada com solução de PBS-Tween 0,05% por três vezes cinco minutos cada lavagem. Posteriormente a MN foi cortada em tiras, devidamente identificadas e divididas em tubos de ensaio de 5 mL com solução de PBS 1X. A estes tubos foram adicionados os soro dos animais e os controles positivo e negativo numa diluição de 1:50 e incubados por 30 minutos. Em seguida, realizaram-se três lavagens com PBS-Tween 0,05% cinco minutos cada lavagem. Foi colocado o conjugado Sigma[®] (A 5420), IgG anti-cabra conjugado com peroxidase, diluído em PBS 1X (1:20000) por 60 minutos. As tiras foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0,05% e duas vezes com PBS 1X, cinco minutos cada. Em seguida foram retiradas dos tubos de ensaio e colocadas em refratário, 10x8 cm. A essas foram adicionados os substratos cromogênicos, 4-Cloro-1-naphthol Sigma[®] (C-6788) e 3,3' Diaminobenzidine (DAB) Sigma[®] (D5637-5G), adicionados de Peróxido de Hidrogênio de H_2O_2 a 30% Fluko Analytical[®] (95313). A revelação das bandas de proteína ocorreu ao abrigo da luz, entre 30 a 60 segundos e a reação foi cessada com adição de água destilada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas para os testes de diagnóstico foram realizadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) com valor estabelecido de ($P < 0,05$) e correção de Yates, utilizando-se o programa estatístico EPI-INFO versão 6.0.

Para o comparativo das médias do IAC, FC, FR, T°C retal e Hemograma Completo, foi utilizado Teste T Student com valor estabelecido de ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A soroconversão ocorreu aos 30 dias após as inseminações com sêmen contaminado com o CAEV, sendo que das 20 cabras inoculadas apenas duas (10%) apresentaram reações de anticorpos anti-CAEV por IDGA, enquanto que por WB, no mesmo período, 12 cabras (60%) reagiram positivamente, sendo duas do grupo BCV e 10 do grupo ACV. Estes resultados sugerem uma baixa sensibilidade do IDGA em detectar precocemente a soroconversão, como já havia sido observado por outros autores (ELTAHIR et al., 2006). Apesar disso, na comparação geral dos resultados, de detecção dos anticorpos anti-CAEV, não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os testes de diagnóstico. Embora, o WB tenha detectado um número maior de animais aos 30 dias, as soroconversões ocorreram ao longo do tempo nas cabras que apresentaram IDGA negativo, confirmando os resultados observados no WB, inferindo então na detecção mais precoce (Figura 4). Assim, ambos os testes empregados puderam detectar os animais infectados, embora o WB tenha apresentado resultados mais constantes (Figura 5). Resultados semelhantes foram encontrados por Rodrigues et al. (2009), quando comparou os dois testes.

Pinheiro et al. (2009), também após comparação desses dois testes, verificaram que o WB foi capaz de detectar 36,36% animais soropositivos a mais que o IDGA. Além disto, o WB apresentou 100% de sensibilidade, enquanto que o IDGA apresentou 73,33% de sensibilidade.

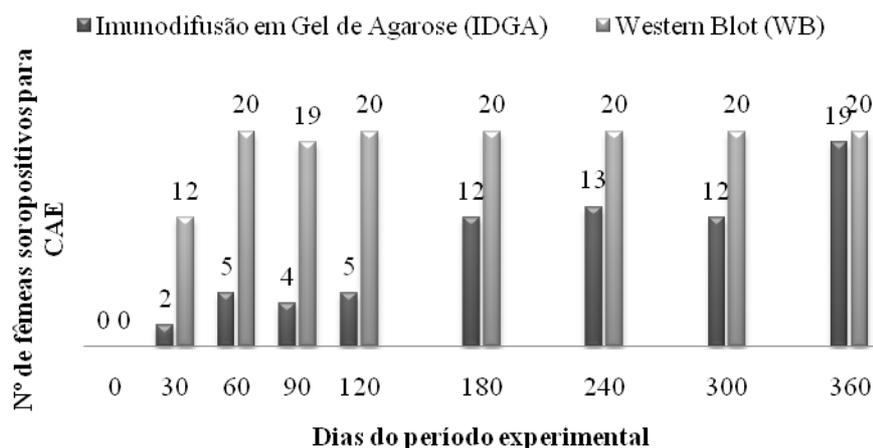


Figura 4: Distribuição das amostras positivas pelos testes de IDGA e WB com 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após as IAs.

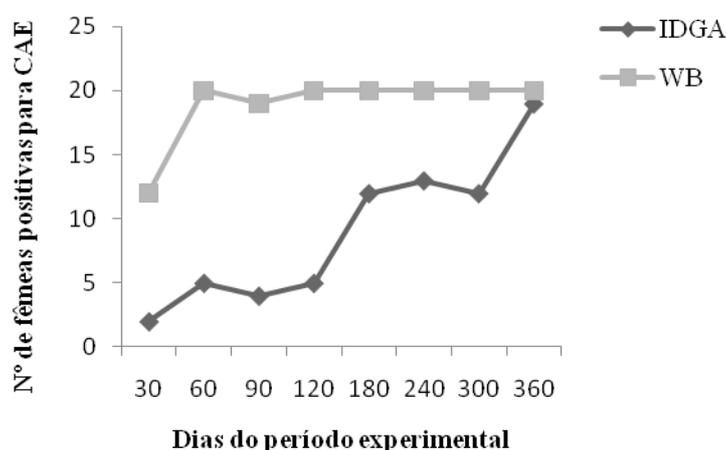


Figura 5: Evolução da soroconversão das fêmeas nos 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 dias após as IAs nos testes de IGDA e W. B.

Em experimento realizado com animais infectados experimentalmente Adams et al. (1980), ao utilizar título semelhante ao do presente trabalho ($10^{6.2}$ TCID₅₀/mL), inocularam o CAEV por via intravenosa e conseguiram detectar anticorpos contra o vírus utilizando a técnica de IDGA aos 21 dias Pós-Inoculação (PI). Já Paula (2008) utilizando machos Moxotó e Canindé inoculados com CAEV (título 10^6 TCID₅₀/mL), observou que a soroconversão intravenosa do vírus ocorreu às 15 semanas após a infecção em quatro dos cinco animais e em um animal a soroconversão ocorreu às 32 semanas PI. Desta forma, uma explicação para a diferença entre os tempos de soroconversão possa ser a diferença de susceptibilidade dos animais, ou ainda, a virulência do agente e a via pela qual o CAEV penetra no organismo pode influenciar na eficiência e no tempo de infecção (GUEDES, 1999).

Nos resultados gerais encontrados neste estudo, observou-se que 100% das cabras inseminadas com o sêmen contaminado apresentaram reações de anticorpos anti-CAEV em algum momento do período experimental (um ano) em pelo menos um dos dois testes de diagnóstico. Nenhuma cabra do grupo controle negativo apresentou reações de anticorpos anti-CAEV. Entretanto, foi constatado que seis cabras do grupo BCV tiveram soroconversão tardia por IDGA, só apresentando resultados positivos aos 12 meses das inseminações, corroborando com Guedes (1999) e Paula et al. (2008). Desta forma, Rimstad et al. (1993) sugere que estudos sobre a transmissão do vírus devem ser realizados até, no mínimo, 12 meses após o desafio. Tendo em vista que o CAEV se trata de um lentivírus, e é caracterizado por possuir um longo período de incubação. De Andrés et al. (2005) recomendam ainda, a associação de pelo menos dois testes num programa de controle da CAE, tornando mais específica a detecção da infecção. Isto é importante porque pode existir falha do próprio teste, como armazenamento inadequado degenerando as proteínas e influenciando a sensibilidade, como também falha técnica incluindo troca de amostra, pipetagem incorreta, transporte ou armazenamento inadequado das amostras de soro, soluções ou kits despadronizados. Contudo, a realização do teste de IDGA isoladamente não demonstra ser suficiente para o controle e detecção da doença, pois há grande risco de se manter no rebanho animais falso-negativos, por ter sido infectado recentemente, ou ainda não produzir anticorpos necessários para detecção pelo teste.

Durante o período experimental foi observado ainda que no IDGA seis cabras apresentaram resultados falso-negativos 42,8% (6/14), independente da titulação. Convém salientar que esse número poderia ser maior, uma vez que seis fêmeas do grupo BCV soroconverteram no último mês de exame, com 360 dias pós-inseminação, embora essas fêmeas vinham mantendo resultados positivos constantes por WB.

Com relação ao número de eventos falso-negativos, isto é o número de resultados negativos após o primeiro resultado positivo foi de 13,3% (8/60) no IDGA e de 0,76% (1/132) no WB. Os resultados estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2. Diante destes resultados constatou-se ($P < 0,001$) que o IDGA apresenta um grande quantidade de resultados falso-negativos quando comparado com o WB, o que muito provavelmente está ligado as proporções antígeno/anticorpo nas reações de precipitação, onde a linha de precipitação só é visualizada quando a proporção Ag/Ac são equivalentes e em quantidade significativa para a formação da linha. Entretanto, apesar de algumas falhas apresentadas pelo IDGA no diagnóstico da CAE, este ainda é o teste

mais utilizado, porque é o preconizado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) como teste diagnóstico para as Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR), o que necessita ser revisto nos programas de controle da doença (PINHEIRO et al., 2006).

Tabela 1 - Resultados da reação de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) dos 30 aos 360 dias após as inseminações nos grupos experimentais.

<i>Dias</i>	<i>30 dias</i>	<i>60 dias</i>	<i>90 dias</i>	<i>120 dias</i>	<i>180 dias</i>	<i>240 dias</i>	<i>300 dias</i>	<i>360 dias</i>	<i>Grupos</i>
<i>Animal</i>									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
2	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
3	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
4	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
5	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
6	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
7	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
8	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
9	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
10	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
11	-	-	-	-	-	-	-	+	BCV
12	-	-	-	-	-	-	-	+	BCV
13	-	-	-	-	+	+	+	+	BCV
14	-	+	-	+	+	+	+	+	BCV
15	-	-	-	-	-	-	-	+	BCV
16	-	-	-	-	-	-	-	+	BCV
17	-	-	-	+	+	-	-	+	BCV
18	-	-	-	-	-	-	-	+	BCV
19	-	-	-	-	+	+	+	+	BCV
20	-	-	-	-	-	-	-	+	BCV
21	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
22	-	+	+	+	+	+	+	+	ACV
23	+	+	-	-	+	+	+	+	ACV
24	-	-	+	-	+	+	+	+	ACV
25	-	-	-	-	+	+	+	+	ACV
26	-	-	-	-	-	+	+	-	ACV
27	-	+	+	+	+	+	+	+	ACV
28	-	-	-	-	+	+	-	+	ACV
29	-	-	-	-	+	+	+	+	ACV
30	-	-	-	-	-	+	+	+	ACV

(CN) = Controle Negativo

(BCV) = Baixa Carga Viral 10^2 TCID₅₀/mL

(ACV) = Alta Carga Viral 10^6 TCID₅₀/mL

Tabela 2 - Resultados da reação do *Western Blot* dos 30 aos 360 dias das inseminações nos grupos experimentais.

<i>Dias</i>	<i>30 dias</i>	<i>60 dias</i>	<i>90 dias</i>	<i>120 dias</i>	<i>180 dias</i>	<i>240 dias</i>	<i>300 dias</i>	<i>360 dias</i>	<i>Grupos</i>
<i>Animal</i>									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
2	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
3	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
4	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
5	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
6	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
7	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
8	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
9	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
10	-	-	-	-	-	-	-	-	CN
11	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
12	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
13	-	+	-	+	+	+	+	+	BCV
14	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
15	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
16	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
17	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
18	+	+	+	+	+	+	+	+	BCV
19	+	+	+	+	+	+	+	+	BCV
20	-	+	+	+	+	+	+	+	BCV
21	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
22	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
23	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
24	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
25	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
26	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
27	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
28	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
29	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV
30	+	+	+	+	+	+	+	+	ACV

(CN) = Controle Negativo

(BCV) = Baixa Carga Viral 10^2 TCID₅₀/mL

(ACV) = Alta Carga Viral 10^6 TCID₅₀/mL

Com relação à avaliação clínica, as frequências cardio-respiratórias, temperatura retal e IAC realizados no decorrer de um ano em todas as fêmeas, apresentaram-se dentro da normalidade para a espécie (SMITH, 1994; PEREIRA et al., 2006). Os movimentos ruminais encontraram-se presentes e normais, do mesmo modo, os linfonodos superficiais apresentaram-se normais a palpação. Contudo, foi observado mucosas orais hipocoradas em pelo menos 18 animais dos três grupos em diferentes momentos do período experimental, provavelmente devido a parasitose gastrointestinal. Estes animais foram tratados com anti-helmínticos e complexo vitamínico Hemolitan[®].

Os resultados médios do IAC, nos três grupos estavam dentro da normalidade. Mesmo assim, foi observada diferença significativa ($P < 0,001$) entre o grupo controle ($4,92 \pm 0,23$) e os grupos infectados ($5,27 \pm 0,41$ e $5,24 \pm 0,39$) para BCV e ACV, respectivamente. Essa diferença provavelmente ocorreu porque duas cabras, uma do grupo ACV e outra do grupo BCV apresentaram aumento sutil das articulações carpianas, oito meses após a soroconversão, e segundo Pinheiro et al. (2005) podem ser consideradas clinicamente suspeitas de problemas articulares, embora nenhuma tenha apresentado evidências de dor ou claudicação. Paula et al. (2008) também observaram IAC superior a 5,0 em três de oito animais avaliados por um período de cinco meses após a infecção.

A frequência cardíaca manteve-se dentro da normalidade, entre (70-130 bat/min), como também a frequência respiratória (10-40 mov/min), durante todo experimento, estando de acordo com outros autores (SMITH, 1994; PEREIRA et al., 2006; PAULA et al., 2008). Ocorreram algumas variações que podem estar mais relacionadas ao comportamento dos caprinos, visto que eram animais pouco adaptados ao manejo, do que propriamente aos sinais clínicos da enfermidade. Durante as avaliações, não foram constatados intolerância a exercício, dispnéia ou tosse seca, sintomas significativos de problemas do aparelho respiratório de animais infectados.

As temperaturas retais também apresentaram médias dentro dos valores normais da espécie, entre 38,6°C e 40°C (SMITH, 1994) com exceção de três fêmeas do grupo BCV que apresentaram um leve aumento da temperatura (41°C), posteriormente mantiveram temperaturas constantes durante todo o período de avaliação.

Com relação ao hemograma completo avaliado no início e no fim do período experimental foi observada que os valores gerais encontravam-se dentro da normalidade concordando com Pinheiro et al. (2000) e Barros Filho et al. (2003), que ao avaliarem animais soronegativos e soropositivos não observaram diferenças no leucograma e

eritrograma desses animais. Já Paula et al. (2008), observaram que o eritrograma de reprodutores infectados pelo CAEV estavam a baixo da faixa de normalidade para caprinos.

Foi verificado neste experimento, que apenas 10% das fêmeas apresentaram alteração dos parâmetros clínicos da enfermidade e apenas no IAC. O que muito provavelmente está ligada a cronicidade desta virose e ao curto período de tempo (12 meses) observado desde a inoculação viral. Visto que, a CAE é uma doença incidiosa que geralmente não manifesta sintomatologia ou manifesta lentamente de meses a anos. Segundo Wilkerson et al.(1995) somente 35% dos animais soropositivos apresentam manifestação clínica da enfermidade.

CONCLUSÕES

O IDGA não é um teste adequado para a erradicação da CAE, devendo-se utilizar somente como teste de triagem.

O WB não apresenta 100% de sensibilidade do diagnóstico da CAE, entretanto é capaz de detectar mais precocemente anticorpos anti-CAEV em animais infectados, mantendo-se constante e com menor possibilidade de apresentar resultados falso-negativos em comparação ao IDGA.

Num rebanho, animais acometidos pela CAE com infecção recente podem ser sintomatologicamente imperceptíveis demonstrando o risco e a dificuldade de controle da doença quando não se realiza testes sorológicos periódicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B.; BANKS, K. L.; MCGUIRE, T. C.; PERRYMAN, L. E. Immune responses of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v. 28,n. 2, p. 421-427, 1980

BARROS-FILHO, I. R.; SCHMID-POPAZOGLO, E. M. S.; CIFFONI, E. M. G.; MANGRICH-ROCHA, R. M. V.; SILVA, S. F. C.; PACHALY, J. R. Hemograma de cabras soropositivas e soronegativas para o vírus da artrite-encefalite caprina. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 6, n. 1, p. 67-70, 2000.

BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/index.php>>. Acesso em: 08 set 2008.

DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N. J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 25. n.107, p. 49-62, 2005.

DEMARTINI, J. C.; HALSEY, W.; BOSHOFF, C.; DENNIS, Y.; HOWELL, M. D. Comparison of a Maedi- Visna virus CA-TM fusion protein ELISA with other assays for detecting sheep infected with North American ovine lentivirus strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 71, p. 29-40, 1999.

ELTAHIR, Y. M.; DOVAS, C. I.; PAPANASTASSOPOULOU, M.; KOUMBATI, M.; GIADINIS, N.; VERGHESE-NIKOLAKAKI, S.; KOPTOPOULOS, G. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. **Journal of Virological Methods**, v. 135, p.240-246, 2006.

GOUVEIA, A. M. G.; MELO, L. M.; PIRES, L. L.; PINHEIRO, R. R. Microimunodifusão em Gel de Agar para o diagnóstico sorológico de infecção por Lentivirus de Pequenos Ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 27, 2000, Águas de Lindóia. **Anais... Águas de Lindóia**, 2000. p. 33.

GUEDES, M. I. M. C. **Infecção Experimental pelo vírus da artrite encefalite caprina em cabritos de nove a vinte e sete dias de idade.** 1999. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Área de Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing Leukoencephalitis and Arthritis in goats. **Journal of General Virology**, v. 50, n. 1, p. 69 - 79, 1980.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Código sanitário para los animales terrestres. Disponível em: http://www.oie.int/eng/OIE/organization/em_LR.htm. Acesso em 15 de jun 2008.

PAULA, N. R. O.; ANDRIOLI, A.; CARDOSO, J.F.S.; SOUSA, F.M.L.; SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; ALVES, F.S.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Parâmetros clínicos e hematológicos de reprodutores caprinos infectados naturalmente pelo vírus da artrite encefalite caprina durante a transição da estação seca para chuvosa no Estado do Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 75, n. 2, p. 141-147, 2008.

PEREIRA, V. V.; MEDEIRO, L. F. D.; VIEIRA, D. H.; GUERSON, D.F.; OLIVEIRA, S. P.; LOPES, P. R. B. **Temperatura corporal, frequência respiratória e cardíaca em caprinos pretos e brancos de diferentes idades.** Disponível em: <http://WWW.abz.org.br/files.php?documentos/R0058-26238347891.pdf>. Acesso em: 05 mar 2010.

PINHEIRO, R. R. **Vírus de Artrite Encefalite Caprino: Desenvolvimento padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará.** 2001. 115f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; ANDRIOLI, A. Medidas carpo-metacarpianas como índice articular clínico em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 170 - 173, 2005.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F. Prevalência de infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina no Estado do Ceará, Brasil. **Ciencia Rural**, v. 31, n. 3, 2001.

PINHEIRO, R. R.; OLORTEGUI, C. D. C.; GOUVEIA, A. M. G.; ARAUJO, S. C.; ANDRIOLI, A. Desenvolvimento de *dot-blot* para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite-Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 101, p. 51-56, 2006.

PINHEIRO, R. R. SANTA-ROSA, J. ALVES, F. S. A. Valores dos parâmetros clínicos, líquido sinovial e hemograma na artrite-encefalite caprina viral. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 128-130, 2000.

PINHEIRO, R. R.; SOUSA, A. R.; BRITO, R. L. L.; SANTOS, V. W. S.; ANDRIOLI, A.; DIAS, R. P.; FURTADO, J. R.; ALVES, F. S. F. Métodos sorológicos indiretos para diagnóstico da Artrite-Encefalite Caprina. In: SIMPÓSIO EMBRAPA LABEX DE SANIDADE ANIMAL, 1, 2009, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2009.

PLUMMER, D. T. **An Introduction to Practical Biochemistry**, 2 ed; McGraw-Hill: London, 1979, 362 p.

PUGH, D. C. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.

RIMSTAD, E.; EAST, N. E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; De ROCK, E.; PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p. 1858-62, 1993.

RODRIGUES, A. S.; BRITO, R. L. L.; SANTOS, V. W. S.; DIAS, R. P.; BRITO, I. F.; ANRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R. Comparação de dois testes sorológicos na evolução natural de caprinos leiteiros com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina- dados preliminares. In: SINCORTE, 4, 2009, João Pessoa, **Anais...** João Pessoa, 2009.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. **Goat medicine**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1994. 620 p.

WILKERSON, M. J.; DAVIS, W. C.; BASLER, T.V.; CHEEVERS, W. P. Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 146, p. 1433-1443, 1995.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados deste estudo, pode-se concluir que o Vírus da Artrite-Encefalite Caprina foi transmitido pelo sêmen, sendo a via venérea uma potencial forma de infecção. Portanto, os sistemas de acasalamento merecem atenção especial, principalmente na inseminação artificial, devido ao fato de que um macho infectado pode contaminar um grande número de fêmeas em um rebanho.

Embora os animais estejam infectados e apresentem resposta sorológica aos testes de diagnóstico, os mesmos podem permanecer por um longo período assintomáticos (maior de 12 meses), o que pode impossibilitar a percepção da doença ou de um animal doente no rebanho e desta forma dificultar o controle.

Outro fator agravante para os programas de controle são, os casos de resultados falso-negativos principalmente no teste de IDGA que é tido como o teste padrão para o diagnóstico da CAE.

PERSPECTIVAS

Como os resultados deste estudo foram encontrados com sêmen contaminado experimentalmente, a transmissão sexual de CAEV deve ser estudada com sêmen naturalmente contaminado pelo vírus.

Devem ser realizados ainda, quantificação da carga viral infectante tanto plasmática como seminal e a associação destas com a transmissão sexual do CAEV.

Estudar a evolução clínica da CAE por um maior período de tempo e verificar a partir de que momento da soroconversão a sintomatologia passa a ser manifestada. Estimando a partir de que momento da soroconversão são manifestados os primeiros sintomas.

Estudar a ocorrência do vírus no trato reprodutivo das fêmeas em todas as fases do ciclo estral, bem como os riscos de transmissão do CAEV da fêmea para o macho.