



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

REBECA CAVALCANTE MARINHO

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA
A PARTIR DE AMOSTRAS DE LEITE DE CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS**

FORTALEZA

2013

REBECA CAVALCANTE MARINHO

ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA A
PARTIR DE AMOSTRAS DE LEITE DE CABRAS NATURALMENTE
INFECTADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecário(a) Responsável – Thelma Marylanda Silva de Melo - CRB-3/623

M337i Marinho, Rebeca Cavalcante.

Isolamento do vírus da artrite encefalite caprina a partir de amostras de leite de cabras naturalmente infectadas / Rebeca Cavalcante Marinho. — 2013.

CD-ROM 52f. : il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fátima da Silva Teixeira.

1. Cultivo celular. 2. Fibroblastos. 3. Sincício. 4. Nested-PCR. I. Título.

CDD: 636.089

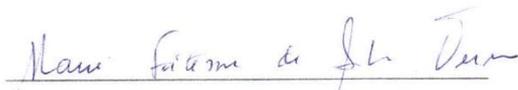
REBECA CAVALCANTE MARINHO

ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE
CAPRINA A PARTIR DE AMOSTRAS DE LEITE DE CABRAS
NATURALMENTE INFECTADAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 17/07/2013

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientador



Profª. Dra. Lorena Mayana Beserra de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará
Examinador



Profª. Dra. Edmara Chaves Costa
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB
Examinador

DEDICATÓRIA

À Deus,

por sempre iluminar os meus caminhos e por estar presente em todos os momentos dessa jornada, me dando forças para continuar mesmo nos momentos de maior dificuldade.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que Ele já me permitiu conquistar e por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos.

A Universidade Estadual do Ceará por disponibilizar condições técnica e pessoal para realização deste trabalho.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

Ao meu marido, Raimundo Teles de Menezes Filho, por todo amor, carinho, respeito e apoio para que eu nunca desistisse de alcançar esse objetivo. Agradeço meu amor, pelas palavras de incentivo e por ter tido paciência enquanto eu concluía mais essa etapa da minha vida. Amo você.

A minha mãe, Cira Nina Cavalcante Soares, e a minha irmã, Isabel Cavalcante Marinho, por todo amor e apoio que vocês me deram e me fizeram forte para continuar lutando.

A minha avó, Leona por todas as orações que sempre faz por mim. Mesmo tendo partido desta vida antes de me ver realizar este sonho, sei que sempre estará intercedendo por mim e me protegendo por toda a minha vida. Te amo vizinha.

A minha orientadora Profa. Dra. Fátima Teixeira que colaborou com a minha formação durante a realização desse mestrado, com quem pude aprender muito. Agradeço pela oportunidade e por toda a sua atenção, amizade, carinho e interesse em sempre me ensinar.

Aos meus amigos do LABOVIR, especialmente ao Rosivaldo Junior, Igor Barroso e D'ávila Aguiar, por todos os bons momentos que vivemos durante esses anos e pelo apoio para a realização deste trabalho.

A minha amiga, Gabrielle Rosembli Martins, que para mim é, e sempre será, um exemplo a ser seguido. Uma pessoa que admiro muito pela competência, pelo caráter e pela amizade incondicional. Agradeço, por todo apoio e suporte que você me deu para que eu conseguisse concluir esse trabalho, pelas palavras de incentivo quando passei por momentos difíceis e pelas inúmeras conversas que tivemos durante todos esses anos, com certeza me fizeram crescer muito.

RESUMO

O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um *Lentivirus* que acarreta enfermidade infecciosa multissistêmica e incurável em caprinos. A principal forma de transmissão dessa enfermidade é a partir da ingestão de leite e de colostro contaminados. Este trabalho objetivou isolar o CAEV em amostra de leite de cabras naturalmente infectadas em um período de 35 dias após parição. Foram coletadas 13 amostras de leite de cabras positivas para Artrite Encefalite Caprina (CAE) diagnosticada através de teste sorológico. As amostras de leite foram processadas e o *pellet* contendo células do leite foi ressuscitado em MEM (Meio Essencial Mínimo) acrescido de 3% de antibiótico, 1,5% de antifúngico, 10% de soro fetal bovino e 1% de glutamina. Foram distribuídas em placas de cultivo e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após três dias de cultivo, as células do leite foram avaliadas para realização do co-cultivo. Identificou-se em uma das amostras, o desenvolvimento de fibroblastos de tecido mamário além das células do leite. No decorrer de cinco dias do cultivo foi possível observar o surgimento de efeito citopático (ECP). O sobrenadante do cultivo celular foi coletado para realização da Nested-PCR e a placa foi corada pelo Giemsa para melhor visualização do ECP. O resultado da Nested-PCR realizada foi positivo para presença do DNA pró-viral, confirmando o isolamento viral. É possível concluir que o CAEV pode ser isolado a partir de amostras de leite caprino, considerando a possibilidade de transmissão no período de um mês após da parição onde o vírus foi isolado por cultivo e por PCR.

Palavras-Chave: Cultivo celular. Fibroblastos. Sincício. Nested-PCR.

ABSTRACT

The Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is a lentivirus that causes multisystem infectious and incurable disease in goats. The main mode of transmission of this disease is from the ingestion of contaminated milk and colostrum. This study aimed to isolate CAEV in milk sample of naturally infected goats in a period of 35 days after calving. We collected 13 samples of milk of goats positive for caprine arthritis encephalitis (CAE) diagnosed by serological testing. The samples were processed and the pellet containing milk cells was resuspended in MEM supplemented with 3% antibiotic, antifungal 1,5%, 10% fetal bovine serum and 1% glutamine. Were distributed into culture plates and incubated at 37°C and 5% CO₂. After three days of cultivation, the milk cells were evaluated for realization of co-cultivation. Was identified in the samples, the development of mammary tissue fibroblasts cells beyond the milk. During five days the cultivation was possible to observe the appearance of cytopathic effect (CPE). The supernatant was collected for the growing realization of the nested PCR and the plate was stained for better visualization of cytopathic effect (CPE). The other samples showed bacterial contamination and were discarded. The result of nested PCR performed was positive for the presence of proviral DNA, confirming the viral isolation. It was concluded that CAEV can be isolated from goat milk samples, considering the possibility of transmission within one month after calving where the virus has been isolated by culture and PCR.

keywords: Cell culture. Fibroblasts. Syncytium. Nested-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito citopático de formação de sincício em fibroblasto de glândula mamária de animal positivo para infecção por CAEV.....36

Figura 2. Detecção do DNA pró-viral do CAEV na amostra de sobrenadante de cultivo celular referente ao animal 078. Linha 1 corresponde ao marcador molecular de 100pb, linha 2 controle negativo, linha 3 controle positivo e linha 4 amostra positiva.....36

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Levantamento soro-epidemiológico para Artrite Encefalite Caprina (CAE) em estados da região Nordeste do Brasil.....	17
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da avaliação dos animais pelas técnicas de IDGA, PCR de amostras sanguíneas e cultivo celular.....	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIEV – Vírus da Anemia Infecciosa Equina
BIV – Vírus da Imunodeficiência Bovina
CAE – Artrite Encefalite Caprina
CAEV – Vírus da Artrite Encefalite Caprina
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
env – Gene que codifica as proteínas do envelope viral
FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations
FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina
G – Unidade da força centrífuga relativa
g – gramas
gag – gene viral que codifica as proteínas internas do vírus
gp – Glicoproteína
HIS – Hibridização *in situ*
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDGA – Imunodifusão em Gel de Agarose
IN – Integrase
LVPR – Lentivírus de Pequenos Ruminantes
MEM – Meio Essencial Mínimo
MSC – Membrana sinovial caprina
MSO – Membrana sinovial ovina
MV – Maedi-Visna
MVV – Maedi-Visna Vírus
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
PCR – Reação em cadeia polimerase
pol – Gene que codifica as enzimas virais
rev – Gene de regulação viral
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
RT – Transcriptase reversa
SNC – Sistema Nervoso Central
SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia
vif – Gene de regulação viral
UECE – Universidade Estadual do Ceará

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA.....	15
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	15
2.3 EPIDEMIOLOGIA	16
2.4 PATOGENIA.....	17
2.5 SINAIS CLÍNICOS	19
2.6 DIAGNÓSTICO	19
2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	22
3 JUSTIFICATIVA.....	24
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	25
5 OBJETIVOS.....	26
5.1 OBJETIVO GERAL	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6 CAPÍTULO 1	27
7 CONCLUSÕES.....	42
8 PERSPECTIVAS	43
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXO	53

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a caprinocultura leiteira vem assumindo papel de destaque no agronegócio brasileiro, principalmente na Região Nordeste, que tem contado com incentivos governamentais, que vem tornando essa atividade cada vez mais promissora (BANDEIRA et al., 2007).

O leite de pequenos ruminantes, cabras e ovelhas, tem particular importância em algumas regiões do mundo, pois é utilizado para combater o problema da desnutrição (HAENLEIN, 2004). Além disso, o leite de cabra também pode ser útil nos casos de alergia alimentar ao leite bovino, uma vez que apresenta sítios alergênicos diferentes do leite de vaca e as chances de sucesso nesse tratamento são de cerca de 10% (BRANDÃO et al., 2003).

O Nordeste brasileiro detém mais de 90% do total efetivo de caprinos do Brasil, tanto para a produção leiteira como de carne. O estado do Ceará ocupa o quarto lugar entre os estados da região, sendo detentor de 11% do total de animais (IBGE, 2010). No entanto a produção de caprinos na Região Nordeste é limitada devido à ausência ou uso inadequado de tecnologias; bem como às falhas no manejo nutricional, reprodutivo e sanitário dos animais (PINHEIRO, 2004).

Dentre as inúmeras enfermidades que reduzem a produtividade dos caprinos pode-se destacar a Artrite Encefalite Caprina, síndrome multissistêmica causada pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) (NARAYAN, 1990). A maioria das cabras infectadas pelo CAEV é susceptível a colonização viral da glândula mamária, visto esta ser um órgão-alvo do patógeno (LERONDELLE et al., 1988). Adicionalmente, sabe-se que o leite caprino é composto por células somáticas, representadas por células de defesa que o organismo animal remete ao úbere em resposta a uma injúria de natureza física, química ou infecciosa, além de células epiteliais de descamação do epitélio mamário (MAGALHÃES, 2005). Sendo assim, é possível a realização do isolamento e identificação do CAEV por meio do co-cultivo de células presentes no leite e no colostro com células de membrana sinovial de cultivo primário caprino (CORK; NARAYAN, 1980; HÖTZEL et al., 1993).

Verificando a importância do leite na transmissão do CAEV bem como na patogenia da doença em questão, esse trabalho teve como objetivo realizar o isolamento do CAEV a partir de amostras de leite de cabras coletadas após 35 dias da parição, através do co-cultivo em células de membrana sinovial caprina (MSC).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA

No Brasil, o primeiro registro sorológico da CAE em caprinos foi realizado em 1986 no Rio Grande do Sul (MOOJEN et al, 1986) e em 1992, na mesma região, foi realizado o primeiro isolamento do vírus (HOTZEL et al,1993).

A artrite-encefalite caprina é uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, incurável e de caráter crônico que acomete caprinos jovens e adultos, independente do sexo, raça e tipo de produção (CORK et al., 1974; LARA et al., 2005). Essa enfermidade acomete as articulações, pulmões e glândula mamária de caprinos adultos e pode afetar o sistema nervoso central de animais jovens (NARAYAN et al., 1983; LECHNER et al., 1997; FRANKE,1998;).

A enfermidade é conhecida internacionalmente como CAE, abreviação do termo em inglês: *caprine arthritis-encephalitis* (FRANKE, 1998). Foi descrita pela primeira vez na Suíça, em 1959, quando foi observado a ocorrência de artrite crônica em caprinos adultos (STÜNZI et al., 1964) e posteriormente, verificou-se a ocorrência de encefalomielite desmielinizante em cabritos jovens (CORK et al, 1974). Em 1980 essa patologia foi reconhecida como virose e, seu agente reconhecido como um lentivírus (CRAWFORD et al.,1980, Narayan et al., 1980) e classificado na família Retroviridae (ICTV, 2011).

A infecção pelo CAEV é caracterizada por um período prolongado de latência, na ausência de transformação oncogênica nas células hospedeiras e tropismo principalmente por monócitos/macrófagos e células dendríticas (HUSO et al., 1988).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um RNA vírus, não oncogênico, pertencente à família Retroviridae e subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus* (ICTV, 2011). Neste gênero, estão inclusos outros vírus de interesse médico e veterinário como o Maedi-Visna vírus (MVV), o vírus da anemia infecciosa equina (AIEV), os vírus das imunodeficiências felina (FIV), bovina (BIV), símia (SIV) e humana (HIV-1, HIV-2) (CLEMENTS; PAYNE, 1994) e o vírus da doença de jembrana (JDV) (BURKALA et al., 1998).

Os lentivírus apresentam-se como partículas esféricas, envelopadas com diâmetro variando de 80 a 100nm, com núcleo cônico e denso, que contém duas moléculas idênticas de RNA fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de Mg^{2+} e proteínas do nucleocapsídeo (GONDA et al., 1986). O envelope viral apresenta-se associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias e de superfície. Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz que está situada entre o capsídeo e o envelope (PEPIN et al., 1998).

O genoma viral do CAEV contém os genes codificantes de proteínas estruturais (*gag* e *env*) e de enzimas (*pol*). O gene *gag* codifica as proteínas estruturais da matriz e do capsídeo e nucleocapsídeo viral; o gene *env* codifica as glicoproteínas de superfície e transmembranar, constituintes do envelope viral, enquanto o gene *pol* codifica as várias enzimas responsáveis pelo processo de transcrição reversa e integração proviral (RT-transcriptase reversa, PR-protease e IN-integrase). O genoma viral ainda apresenta os genes acessórios *tat*, *vif* e *rev* que codificam proteínas reguladoras envolvidas no processo de replicação viral (CLEMENTS; PAYNE, 1994; JOAG, 1996).

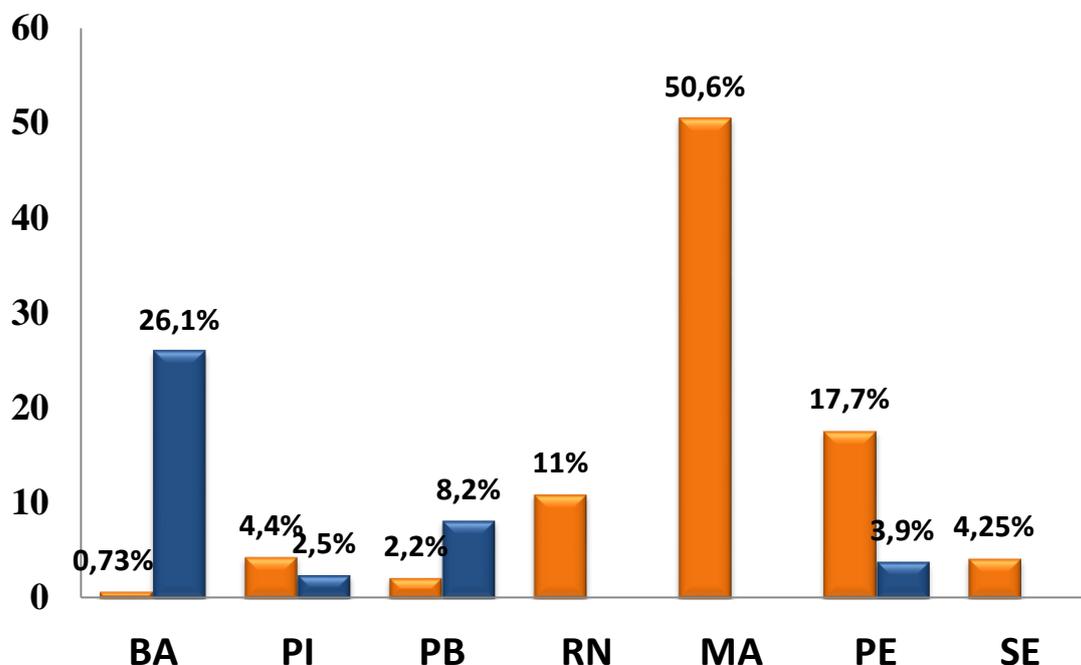
2.3 EPIDEMIOLOGIA

Na região Nordeste foram realizados inúmeros levantamentos epidemiológicos e verificou-se a prevalência de animais soropositivos para CAE de 50,6% no Maranhão (ALVES; PINHEIRO, 1997), de 17,7% e 3,9% em Pernambuco (CASTRO et al., 1994; CASTRO et al., 2002), de 4,25% em Sergipe (MELO et al., 2003), de 2,5% no Piauí (BATISTA et al., 2004), de 11,0% no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2005), 26,1% na Bahia (TIGRE et al., 2006) e de 8,2% na Paraíba (BANDEIRA et al., 2009). Esses dados podem ser melhor compreendidos ao visualizar o gráfico 01, onde estão representados em porcentagens os levantamentos epidemiológicos em diferentes estados e ocasiões distintas.

No Ceará, o primeiro registro dessa infecção ocorreu em animais de raças leiteiras no município de Sobral (PINHEIRO et al., 1989). Em 2004, verificou-se que a prevalência da CAE no Ceará, por propriedade, foi de 9,2% sendo que 66,7% das propriedades estavam localizadas na região metropolitana de Fortaleza. O mesmo estudo verificou que os animais que estavam submetidos ao regime de criação intensivo foram acometidos pela enfermidade (PINHEIRO et al., 2004). A partir desses dados, é possível entender que o regime de criação intensivo favorece a disseminação da CAE,

uma vez que os animais encontram-se mais próximos e há um maior contato com os fluidos corporais que podem conter partículas virais.

Gráfico 1. Levantamento soro-epidemiológico para Artrite Encefalite Caprina (CAE) em estados da região Nordeste durante o período de 1994 a 2009.



2.4 PATOGENIA

O vírus da Artrite Encefalite Caprina causa uma enfermidade crônica com um grande período de latência, porém, não possui a característica de ser oncogênico (CLEMENTS; PAYNE, 1994). Os animais infectados atuam como reservatório viral e uma importante fonte de infecção para os rebanhos, estes transmitem o agente por meio de secreções ou excreções que contenham células do sistema monocítico-fagocitário infectadas (BLACKLAWS et al., 2004).

A principal via de transmissão do CAEV é por meio da ingestão de colostro ou leite contaminado, além do contato prolongado entre os animais por meio da inalação de aerossóis (ROWE; EAST, 1992). Além disso, a transmissão pode ocorrer por via intramamária durante o processo de ordenha quando o equipamento está contaminado pelo leite de animais infectados (EAST et al, 1993). Há indícios da ocorrência da transmissão venérea do CAEV, estudos recentes detectaram a presença do vírus no trato genital e no

semên de animais naturalmente infectados (ALI AL AHMAD et al., 2008) e a presença do DNA-proviral no sêmen de animais soropositivos já foi comprovada (ANDRIOLI et al, 1999; CRUZ et al, 2009), mais recentemente, foi verificado a ocorrência da transmissão do CAEV por inseminação artificial com a utilização de sêmen infectado (SOUZA et al., 2013).

O CAEV replica-se preferencialmente em células do sistema monocítico-fagocitário, ou seja, em monócitos no sangue e macrófagos nos demais tecidos, sendo a medula óssea o principal reservatório de células infectadas (BLACKLAWS et al., 2004). Esse processo de replicação viral depende da ocorrência de maturação de monócitos em macrófagos e este fato, associado com a habilidade de se replicar em macrófagos são fatores chaves para a progressão da enfermidade. Os macrófagos são células de vida longa que derivam de pró-monócitos na medula óssea, circulam como monócitos no sangue e são distribuídos para todos os tecidos do corpo, onde são maturados e diferenciados em macrófagos teciduais. Pró-monócitos infectados latentemente podem ser detectados na medula óssea de animais infectados experimentalmente logo após inoculação e durante todo o curso da doença (ZINK; JOHNSON, 1994).

Em decorrência de a replicação viral ser maturação dependente, essas células imaturas da linhagem macrófago podem permanecer persistentemente infectadas por longos períodos. Na ausência de expressão de antígeno viral, o sistema imune do hospedeiro é incapaz de detectar o vírus. A medula óssea então age como um reservatório de vírus, liberando de forma contínua e persistente monócitos infectados para o sangue periférico, os quais são distribuídos por todo o corpo. Quando as células maturam no tecido, a expressão gênica viral é regulada e o antígeno viral é então exibido para o sistema imune do hospedeiro (ZINK; JOHNSON, 1994).

A inflamação crônica e progressiva que caracteriza essa lentivirose deve-se a infiltração de células mononucleares e linfoproliferação. A produção do vírus ocorre após monócitos infectados se desenvolverem a macrófagos. Os antígenos virais provocam resposta imunológica mediada por células, que é responsável pelas lesões características nos tecidos-alvo (QUINN et al., 2005).

O período que vai da infecção à soroconversão geralmente é de até oito semanas, mas pode demorar meses ou anos. Essa demora na resposta de anticorpos reflete um baixo nível na produção de antígenos virais (QUINN et al., 2005).

2.5 SINAIS CLÍNICOS

A manifestação sintomatológica da CAE pode ser dividida em quatro aspectos clínicos principais, podendo ocorrer de forma isolada ou simultânea, incluindo artrite, encefalite, mamite e pneumonia (FRANKE, 1998).

A principal apresentação clínica observada em animais adultos é a artrite (LARA et al, 2005). Dentre as articulações acometidas verifica-se que a articulação carpiana é a mais afetada, onde se observa aumento na consistência e no volume do local e bem como o quadro de poliartrite crônica (CRAWFORD; ADAMS, 1981), sendo que o grau de claudicação é variável (QUINN et al., 2005).

Essa enfermidade pode acometer o sistema respiratório dos caprinos, no entanto, esse achado é raro e de pouca gravidade e, quando presente, os sinais clínicos observados são tosse, dispnéia após esforço físico, taquipnéia e comprometimento do estado geral (NARAYAN; CORK, 1985).

A apresentação nervosa da enfermidade é caracterizada por leucoencefalomielite e sua ocorrência é predominante em animais jovens com idade variando de um a quatro meses. Os sintomas que podem ser observados em animais com o quadro nervoso da CAE são: fraqueza muscular, paresia ou ataxia dos membros posteriores, andar em círculo, cegueira, nistagmo, tremores e inclinação da cabeça (CORK et al., 1974; LARA et al., 2005).

O animal pode apresentar também a forma mamária da doença, o que influencia na produção leiteira. Através da técnica de PCR foi possível detectar a presença do vírus no parênquima mamário e no leite de animais acometidos por CAE (GREGORY et al, 2009). A avaliação clínica desses animais demonstra o endurecimento difuso do parênquima da glândula mamária (LARA et al, 2005, GREGORY et al, 2009) bem como a presença de nódulos com tamanho variando de 1 a 3 cm de diâmetro (GREGORY et al, 2009). Esse comprometimento mamário é frequente, e com grande significado econômico em face do comprometimento da produção leiteira e predisposição a infecções secundárias da glândula mamária (LERONDELLE, 1988).

2.6 DIAGNÓSTICO

A CAE se caracteriza como uma afecção multissistêmica, com manifestações clínicas de pneumonia, artrite, mamite ou encefalite, de evolução geralmente crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte

(NARAYAN; CORK, 1985). Porém, por se tratar de uma infecção persistente e geralmente assintomática, o diagnóstico através de uma avaliação clínica da CAE não pode ser considerado confirmatório devendo-se recorrer a testes laboratoriais (PINHEIRO, 2001).

Existem inúmeros métodos laboratoriais que auxiliam no diagnóstico dessa enfermidade, dentre eles, o isolamento do vírus por co-cultivo celular, microscopia eletrônica, reação em cadeia de polimerase (PCR), imunodifusão em gel de agarose (IDGA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA).

Para o diagnóstico sorológico, o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) é o recomendado pela OIE (2006), por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas. Esse teste baseia-se na migração do antígeno e anticorpo através do gel de agarose. O encontro dos reagentes, em proporções ótimas, leva à formação de complexos antígeno-anticorpo insolúveis que precipitam, formando-se uma linha ou banda de precipitação visível (TORTORA et al., 2000).

Apesar de apresentar alta especificidade, o IDGA não é um teste recomendado para diagnóstico precoce da doença devido a sua baixa sensibilidade, despertando, assim, o interesse pelo desenvolvimento dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Estudos demonstram que o teste ELISA apresenta maior sensibilidade quando comparado com o IDGA (DANTAS et al, 2008).

Existem vários tipos de ELISA, como o direto, indireto, duplo sanduiche direto e o ELISA duplo sanduiche indireto. O ELISA indireto é um teste amplamente utilizado para detecção de anticorpos em amostras de soro, sendo a sua especificidade garantida pela qualidade do antígeno que foi adsorvido na placa (MADRUGA et al, 2001). Nesse teste são utilizadas duas IgG, sendo uma para o reconhecimento do antígeno e a outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual irá se ligar (ALMEIDA; LIMA, 2001).

A RIFI também é uma técnica recomendada pela OIE, e tem sido utilizada no diagnóstico de infecção em ovinos e caprinos, utilizando-se como antígeno os isolados brasileiros de lentivírus. Quando comparada ao IDGA a RIFI apresenta maior capacidade de detectar os animais positivos (REISCHAK et al, 2002). No entanto, a exposição à fonte de luz ultravioleta é desgastante, tornando o técnico mais susceptível a erros e, conseqüentemente na precisão do teste, assim o IDGA permanece como teste

de escolha para o diagnóstico da CAE, devido à maior facilidade de execução e leitura e, por requerer infraestrutura laboratorial mínima (REISCHAK, 2000).

O isolamento e identificação do vírus por meio do cultivo de tecido, incluindo a explantação de tecidos articulares, pulmonares, do sistema nervoso e de glândula mamária; e o co-cultivo em células de membrana sinovial de cultivo primário caprino com células sanguíneas, colostro, leite, lavado brônquio-alveolar e líquido cefalorraquidiano representa um diagnóstico determinante (CORK; NARAYAN, 1980; HÖTZEL et al., 1993), sendo as culturas primárias de células de membrana sinovial as mais usadas para o isolamento e caracterização biológica do CAEV (CRAWFORD et al., 1980; NARAYAN et al., 1980).

Porém, por ser uma técnica demorada, dispendiosa, e que requer a implantação e manutenção de cultivos celulares especiais não é utilizada rotineiramente para o diagnóstico dessa doença (KNOWLES, 1997). Trabalhos recentes conseguiram realizar o isolamento do CAEV a partir de amostras de leite de cabras (GOMEZ-LUCIA et al., 2012; CARDINAUX et al.; 2013). Sabe-se que o isolamento de cepas regionais contribui para um melhor conhecimento da diversidade genética circulantes desses vírus e pode ainda contribuir para melhorar o controle da doença (FEITOSA et al., 2011).

Atualmente, as técnicas laboratoriais de biologia molecular vêm sendo muito utilizadas visando o diagnóstico precoce das lentivirose, sendo a PCR uma técnica muito sensível, representando uma alternativa na identificação de animais com sorologia negativa ou dúbia (RIMSTAD et al., 1993). Inúmeras amostras biológicas podem ser utilizadas para a detecção do vírus pela técnica de PCR, estudos têm demonstrado a presença do vírus em amostras de líquido sinovial (REDDY et al, 1993), sangue e leite de animais infectados (RIMSTAD et al., 1993; REDDY et al, 1993). Estudos recentes tem demonstrado que o leite pode ser utilizado como material biológico para realização do diagnóstico precoce da CAE por meio da técnica de PCR (BRINKHOF et al, 2010).

A utilização de amostras de leite para o diagnóstico da CAE apresenta a vantagem de uma coleta mais fácil e independente de uma mão de obra especializada, o que torna a realização do exame mais prática e econômica. Estudos demonstram que amostras individuais de leite podem ser utilizadas para realização do diagnóstico da CAE pela detecção de anticorpos pela técnica de ELISA (MOTHA;RALSTON, 1994) e que há uma correlação substancial na detecção de anticorpos entre amostras de sangue e

de leite, apoiando a hipótese de que amostras de leite podem ser utilizadas como alternativa ao diagnóstico sorológico dessa enfermidade (BARQUERO et al, 2011).

Além disso, verifica-se que a aplicação da sorologia em combinação com a PCR aumenta potencialmente sensibilidade do diagnóstico da CAE. Estudos demonstraram que a realização de PCR em amostras de leite individual e a granel apresentaram resultados favoráveis, demonstrando que o leite pode ser utilizado como um substituto do sangue para realização do diagnóstico da CAE. Além disso, a realização da PCR em um *pool* de amostras de leite apresenta uma excelente relação custo benefício, visto que ao invés de serem realizados inúmeros testes individuais semestralmente seria realizado o exame por um *pool* de amostras de leite de vários animais (BRINKHOF et al, 2010).

2.7 PREVENÇÃO E CONTROLE

Atualmente não se encontra disponível nenhum tratamento contra a Artrite Encefalite Caprina (REINA et al., 2009) devendo-se, então, recorrer a medidas de controle eficazes visando impedir a introdução como também a disseminação desse vírus pelo rebanho (CASTRO, 1998). No entanto, apesar da inexistência de tratamento, ARAÚJO (2008) ao estudar a atividade antiviral de drogas inibidoras da enzima transcriptase reversa (lamivudina, estavudina, zidovudina e efavirens), verificou que estas foram capazes de inibir, *in vitro*, a replicação de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR). Ainda nesse mesmo estudo, foi avaliada a atividade antiviral dos extratos de cinamomo (*Melia azedarach* L.) e nim (*Azadirachta indica* A. Juss), verificando-se que estes também inibiram, *in vitro*, a replicação do vírus da artrite encefalite caprina.

O diagnóstico precoce dessa doença é uma importante ferramenta de controle, visto que permite a separação de animais sadios dos portadores do vírus, impedindo a transmissão horizontal pelo contato direto entre os animais, através de secreções e excreções, como fezes, saliva, secreções urogenitais e respiratórias (ANDRIOLI et al, 2007).

Além disso, deve-se realizar a separação dos recém-nascidos de fêmeas infectadas logo após o nascimento, antes da ingestão de colostro; manutenção dos cabritos em isolamento, alimentando-os artificialmente com colostro de animais negativos aquecido a 56° C ou colostro artificial; aquisição de animais

comprovadamente negativos e oriundos de rebanhos negativos; evitar o uso de sêmen de machos infectados; estabelecer uma ordem de ordenha em rebanhos de caprinos leiteiros, ordenhando fêmeas jovens e negativas antes de fêmeas velhas e positivas (REINA et al., 2009), bem como pode-se recorrer à técnica de transferência de embrião para a obtenção de crias negativas oriundas de fêmeas soropositivas, desde que sejam seguidas todas as normas sanitárias recomendadas (ANDRIOLI et al, 2007).

Quando a prevalência for maior do que 30% sugere-se a formação de um rebanho de animais negativos separado dos positivos, de modo a estabelecer o saneamento da propriedade mediante um rigoroso manejo sanitário de ambos os grupos e da gradativa eliminação do grupo dos animais infectados (FRANKE, 1998).

3 JUSTIFICATIVA

A caprinocultura representa uma atividade pecuária de importância mundial, estando mais concentrada em áreas tropicais ou semiáridas. A Artrite encefalite caprina é considerada uma enfermidade de grande impacto nas criações de caprinos, apresentando significativo impacto na economia, principalmente na região Nordeste do Brasil. A ingestão do leite caprino é a principal forma de transmissão do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) para os pequenos ruminantes.

Apesar disso, os estudos enfatizando o diagnóstico e a transmissão do CAEV através do leite são escassos. A CAE, até o presente momento, não dispõe de vacinas e nem antivirais comercialmente disponíveis, restando como alternativa de controle dessa enfermidade o seu diagnóstico adequado e precoce.

Sabe-se que o isolamento de cepas regionais contribui para um melhor conhecimento da diversidade genética circulantes desses vírus e pode ainda contribuir para melhorar o controle da doença.

Desta forma, este trabalho propõe realizar o isolamento do vírus a partir de amostras de leite de cabras em um período de trinta dias após a parição, a fim de enfatizar o papel do leite como material biológico de grande importância para a transmissão do CAEV para os caprinos de forma a contribuir para prevenção e controle dessa enfermidade.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O Vírus da Artrite Encefalite Caprina pode ser isolado de leite de cabras naturalmente infectadas no período de 35 dias do pós-parto através do co-cultivo primário com membrana sinovial caprina.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar o Vírus da Artrite Encefalite Caprina em amostras de leite de cabras após trinta dias da parição utilizando o co-cultivo com membrana sinovial caprina.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cabras naturalmente infectadas pela técnica de IDGA, utilizando amostras de sangue;
- Realizar nested-PCR de amostras de sangue de animais com sorologia inconclusiva;
- Identificar através de co-cultivo de células do leite de cabras naturalmente infectadas o vírus da Artrite Encefalite Caprina.
- Realizar análise molecular do sobrenadante de cultivo celular para confirmação do isolamento viral.

CAPÍTULO 1

Isolamento do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em amostra de leite de cabras naturalmente infectadas.

Isolation of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in a sample of milk from goats naturally infected.

Periódico: Arquivos do Instituto Biológico (Submetido em 09 de Maio de 2013)

**ISOLAMENTO DO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV)
EM AMOSTRA DE LEITE DE CABRAS NATURALMENTE INFECTADAS.**

*ISOLATION OF CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) IN A
SAMPLE OF MILK FROM GOATS NATURALLY INFECTED.*

Rebeca Cavalcante Marinho¹, Maria Fátima da Silva Teixeira¹, Gabrielle Rosembli Martins¹, Igor Ciriaco Barroso¹, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹ e Victor Manuel de Lacerda Freitas¹.

¹Laboratório de Virologia – LABOVIR - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana, 1700, 60120-000, Fortaleza, Ceará, Brasil. E-mail: labovirfavetuece@yahoo.com.br

Resumo O vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) é um *Lentivirus* que acarreta enfermidade infecciosa multissistêmica e incurável em caprinos. O leite e o colostro consistem na principal forma de transmissão. Este trabalho objetivou isolar o CAEV em amostra de leite de cabras naturalmente infectadas em um período de 30 dias após parição. Foram coletadas 13 amostras de leite de cabras positivas para Artrite Encefalite Caprina (CAE) diagnosticada através da técnica de IDGA. As amostras de leite foram processadas e o pellet contendo células do leite foi ressuscitado em MEM acrescido de antibiótico 3%, antifúngico 1,5%, soro fetal bovino 10% e glutamina 1%. Foram distribuídas em placas de cultivo e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após três dias de cultivo, as células do leite foram avaliadas para realização do co-cultivo. Uma das amostras apresentou, além das células do leite, fibroblastos oriundos da própria glândula mamária e após cinco dias do cultivo surgiu efeito citopático (ECP). O sobrenadante do cultivo celular foi coletado para realização da Nested-PCR e a placa foi corada pelo Giemsa para melhor visualização do efeito citopático. As demais amostras apresentaram contaminação bacteriana e foram descartadas. O resultado da Nested-PCR realizada foi positivo para presença do DNA pró-viral, confirmando o isolamento viral. Podemos concluir que o CAEV pode ser isolado a partir de amostras de leite caprino, considerando a possibilidade de transmissão no período de um mês após da parição onde o vírus foi isolado por cultivo e por PCR.

Palavras Chave: Cultivo celular, fibroblastos, sincício, Nested-PCR.

Abstract: The Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is a lentivirus that causes multisystem infectious and incurable disease in goats. The milk and colostrum consist of the main form of transmission. This study aimed to isolate CAEV in milk sample from naturally infected goats. We collected 13 samples of milk from goats proved positive for caprine arthritis encephalitis (CAE) through the AGID. The samples were processed and the pellet containing milk cells was resuspended in MEM supplemented with 3% antibiotic, antifungal 1,5%, 10% fetal bovine serum and 1% glutamine. Were distributed into culture plates and incubated at 37°C and 5% CO₂. After three days of cultivation, the milk cells were evaluated for realization of co-cultivation. One of the samples had, in addition to milk cells, fibroblasts derived from the mammary gland. After five days of cultivation, the sample that contained fibroblasts and milk cells showed cytopathic effect characteristic of syncytium. The supernatant was collected for the growing realization of the nested PCR and the plate was stained for better visualization of cytopathic effect (CPE). The other samples showed bacterial contamination and were discarded. The result of nested PCR performed was positive for the presence of proviral DNA, confirming the viral isolation. Thus, we conclude that the CAEV can be isolated from goat milk samples, given a greater possibility of transmission within one month after calving where the virus has been isolated by culture and PCR.

keywords: Cell culture, fibroblasts, syncytium, nested-PCR.

INTRODUÇÃO

A artrite-encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, incurável e de caráter crônico que acomete caprinos (CORK et al., 1974; LARA et al., 2005). Essa enfermidade é causada pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), um RNA vírus, não oncogênico, pertencente à família Retroviridae e gênero *Lentivirus* (ICTV, 2011). Esse vírus acomete as articulações, pulmões e glândula mamária de caprinos adultos e pode afetar o sistema nervoso central de animais jovens (NARAYAN et al., 1983; FRANKE, 1998; LECHNER et al., 1997).

A principal via de transmissão do CAEV é através da ingestão de colostro ou leite contaminado, bem como devido ao contato prolongado entre os animais por meio da inalação de aerossóis (ROWE; EAST, 1992, BLACKLAWS, 2012). A transmissão também pode ocorrer por via intra-mamária durante o processo de ordenha, quando o

equipamento está contaminado pelo leite de animais infectados (EAST et al, 1993), e foi verificado a ocorrência da transmissão do CAEV por inseminação artificial com a utilização de sêmen artificialmente infectado (SOUZA et al., 2013).

Existem inúmeros métodos laboratoriais que auxiliam no diagnóstico dessa enfermidade, dentre eles, imunodifusão em gel de agarose (IDGA), isolamento do vírus por co-cultivo celular e reação em cadeia de polimerase (PCR). O isolamento e identificação do vírus por meio do cultivo de tecido, incluindo a explantação de tecidos articulares, pulmonares, do sistema nervoso e de glândula mamária; e o co-cultivo em células de membrana sinovial de cultivo primário caprino com células sanguíneas, colostro, leite, lavado brônquio-alveolar e líquido cefalorraquidiano representa um diagnóstico determinante (CORK; NARAYAN, 1980; HÖTZEL et al., 1993). Diferentes amostras de LVPR têm sido isoladas e caracterizadas em diversos estados brasileiros (MARCHESIN et al., 1998; CASTRO et al., 1999; RAVAZZOLO et al., 2001). O isolamento de cepas regionais contribui para um melhor conhecimento da diversidade genética circulantes desses vírus e pode ainda contribuir para melhorar o controle da doença (FEITOSA et al., 2011).

Sabe-se que o leite caprino é composto por células somáticas, representadas por células de defesa que o organismo animal remete ao úbere em resposta a uma injúria de natureza física, química ou infecciosa, além de células epiteliais de descamação do epitélio mamário (MAGALHÃES, 2005). Sendo assim, é possível a realização do isolamento e identificação do CAEV por meio do co-cultivo de células presentes no leite e no colostro com células de membrana sinovial de cultivo primário caprino (CORK; NARAYAN, 1980; HÖTZEL et al., 1993).

Verificando a importância do leite como meio de transmissão do CAEV para os animais recém-nascidos, o objetivo desse trabalho foi realizar o isolamento do vírus da CAE por cultivo celular através do leite de cabras naturalmente infectadas em um período de trinta dias após a parição.

Material e Métodos

Animais e amostras de leite

Todos os caprinos incluídos neste estudo foram obtidos de uma propriedade localizada em Aquiraz-CE.

Inicialmente, os animais foram submetidos a uma avaliação sorológica utilizando Kits comerciais de IDGA (imunodifusão em gel de agarose) da Biovetch ®

de acordo com as recomendações do fabricante. Os animais que não foram positivos ou demonstraram resultado dúbio neste teste, foram submetidos ao diagnóstico pela técnica de Nested-PCR.

Para coleta do sangue para realização da PCR foram utilizados tubos vacutainer® estéreis com heparina. Para extração do DNA dos leucócitos do sangue, as amostras foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos. A capa de leucócitos foi coletada e transferida para *ependorfs*® de 1,5 µL contendo 500 µL de TE (10 mM Tris, 1 mM). O material foi centrifugado em microcentrifuga a 2700g durante 5 minutos para obtenção do *pellet*, em seguida o sobrenadante foi descartado e a operação foi repetida. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em tampão K (10mM de Tris HCl pH 8,0; 50mM de KCl; 2mM de MgCl₂; 0,5% de Tween 20; 100µg/mL de proteinase K= 0,1µg/µL). As amostras foram agitadas em vortex, incubadas a 56°C durante 45 minutos e posteriormente submetidas a fervura a 96°C durante 10 minutos. O material foi armazenado a 4°C até a realização da Nested-PCR (CALDAS et al., 2000).

Do total de animais avaliados, treze fêmeas positivas foram selecionadas durante o período gestacional. No período de lactação, após trinta dias da parição, o leite dessas fêmeas foi coletado de forma asséptica na primeira ordenha do dia, desprezando os três primeiros jatos, sendo coletados em tubos *Falcon*® de propileno de 50 mL.

O leite foi aliqotado em tubos *Falcon*® de propileno de 10 mL e posteriormente centrifugado a 1500 g durante dez minutos. Para retirada da gordura foi utilizado papel toalha e solução salina para ressuscitar o *pellet*. O material foi centrifugado por duas vezes e novamente lavado com solução salina (Adaptado de Brinkhof et al., 2010).

A fim de enumerar e avaliar a viabilidade celular foi utilizada a contagem manual em câmara de Neubauer, sendo as células previamente coradas com o corante vital Azul de Tripan.

Cultivo celular

Após o procedimento de contagem, as células foram distribuídas em microplacas de 24 poços na concentração de 10⁶ células por mL em MEM acrescido de antibiótico 3%, antifúngico 1,5%, soro fetal bovino 10% e glutamina 1% e mantidas à 37°C e 5% de CO₂ (ABREU et al, 1998).

Após 24 horas, foi realizada uma troca de meio, mantendo a mesma composição, e as células do leite foram mantidas, por três dias em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células do leite foram avaliadas para realização do co-cultivo com células de membrana sinovial ovina (MSO) antes deste procedimento foi possível verificar que uma das amostras apresentou, além de células do leite, fibroblastos oriundos da própria glândula mamária.

A amostra contendo células do leite e fibroblastos foi observada periodicamente ao microscópio invertido para verificar a presença de efeito citopático (ECP), sendo a formação de sincícios característico da infecção por lentivírus caprino (ASSO et al., 1990).

Ao final de cinco dias de observação, foram coletadas as amostras do sobrenadante do cultivo celular e congeladas a -20° C e a placa foi corada com Giemsa para melhor visualização do ECP.

Nested-PCR

O sobrenadante de cultivo celular foi colhido e conservado a -20° C para posterior realização da extração do DNA pró-viral. Uma alíquota de um mL desse material foi centrifugada a 2000 g por 5 minutos e o pellet obtido foi ressuspensionado em 500 µL de PBS e centrifugado a 2000g por 5 minutos. Após essa lavagem, um mL de tampão hipertônico (Tris-HCl, MgCl₂, Sacarose) foi acrescentado ao pellet obtido por dois minutos a temperatura ambiente seguido por centrifugação a 1500g por 10 minutos. O DNA celular foi extraído utilizando-se 125 µL de tampão de PCR (Tris-HCl, KCl, MgCl₂, Glicerol, Tween 20) sendo o material incubado a 56° C por 60 minutos com 2,5 µL de proteinase K em banho-maria. A proteinase K foi desnaturada a 95° C por 10 minutos. O DNA extraído foi estocado inicialmente a 4° C durante 24 horas, e posteriormente armazenado a -20° C até sua utilização (Adaptado de CASTRO, 1998).

Para detecção do DNA pró-viral foi realizada a Nested-PCR utilizando *primers* para a região *gag*, sendo realizada em duas etapas de amplificação. Os *primers* utilizados para amplificar esse gene foram desenhados de acordo com Saltarelli et al. (1990). Os *primers* externos GEX5 (5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3') e GEX3 (5'-TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC-3') foram utilizados na primeira amplificação, e os *primers* internos GIN5 (5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3') e GIN3 (5'-

ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC- 3') foram utilizados na segunda amplificação.

A amplificação foi realizada utilizando-se o termociclador (Biocycler®) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguido de desnaturação a 94°C por um minuto, anelamento dos *primers* a 56°C por um minuto e extensão do DNA a 72°C por 45 segundos com extensão final a 72°C por sete minutos. O primeiro e o segundo round da PCR foram realizados em 35 ciclos sob as mesmas condições anteriormente descritas.

Para cada amplificação, foram utilizados controle positivo e negativo de Amostra CAEV-Co em paralelo com as amostras. Após, a amplificação os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio em tampão TBE (Tris-borato-EDTA) 1X. Esse experimento foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará sob o número de protocolo 10130900-7/32.

Resultados e Discussão

Sabe-se que o isolamento e identificação do vírus por meio do co-cultivo células de membrana sinovial em células do sangue, colostro, leite e líquido cerebrospinal representa um diagnóstico determinante (CORK; NARAYAN, 1980; HOTZEL et al., 1993). No presente trabalho foi obtido resultado similar de isolamento de células do leite co-cultivadas com fibroblastos de acordo com o descrito por Cork; Narayan (1980), com a diferença que os fibroblastos foram oriundos da própria glândula mamária do animal, demonstrando a concordância de resultados.

Após realização do cultivo de células do leite, 12 amostras apresentaram contaminação bacteriana e devido a isso não foi possível a realização do isolamento viral, corroborando com Cardinaux et al. (2013) que ao tentar realizar isolamento de CAEV a partir de amostras de leite de cabras também perdeu algumas amostras devido contaminação bacteriana que pode estar relacionada a uma mastite subclínica nos animais.

No entanto, foi possível observar ECP característico de sincício na amostra referente ao animal 078 que continha células do leite e fibroblastos oriundos da própria glândula mamária, que foi visualizado após cinco dias de cultivo (Fig. 01). Este fato está de acordo com o descrito por Gomez-Lucia et al. (2012) e Cardinaux et al. (2013)

que conseguiram realizar o isolamento do CAEV a partir de amostras de leite de cabras, sendo que este último observou a ocorrência de efeitos citopáticos em células de membrana sinovial caprina.

A amostra de leite do animal 078 foi coletada 35 dias após a parição, enquanto no trabalho realizado por Cardinaux et al. (2013) as amostras de leite foram coletadas um dia após a parição, e o de Gomez-Lucia et al. (2012) foi coletado no segundo quarto da lactação, demonstrando que o vírus está sendo eliminado pela glândula mamária em diferentes etapas da lactação.

Sabe-se que a maioria das cabras infectadas pelo CAEV é suscetível à colonização viral da glândula mamária, visto este ser um órgão-alvo do patógeno (LERONDELLE et al., 1988). Adicionalmente, sabe-se que o leite caprino é composto por células somáticas, representadas por células de defesa que o organismo animal remete ao úbere em resposta a uma injúria de natureza física, química ou infecciosa, além de células epiteliais de descamação do epitélio mamário (MAGALHÃES, 2005) e Miselli-Lakhal et al. (1999) demonstraram que as células epiteliais do leite são altamente permissivas a infecção por CAEV *in vitro*.

O diagnóstico sorológico de animais infectados por CAEV pela técnica de IDGA é amplamente utilizada, sendo a técnica recomendada pela OIE (2006), no entanto alguns animais podem apresentar baixos títulos de anticorpos, soroconversão tardia, ou ainda reações intermitentes de soropositividade e soronegatividade (CLAVIJO; THORSEN, 1996; HANSON; HYDBRING; OLSSON, 1996). Corroborando com o relatado, o animal 078 apresentou resultado dúbio para o IDGA, enquanto apresentou-se positivo para PCR com amostra de sangue e isolamento por cultivo celular, o que confirma a necessidade de investimento em técnicas laboratoriais mais específicas para diagnóstico preciso dessa enfermidade. Na tabela 1, é possível visualizar os resultados dos testes de IDGA, a reação de cadeia em polimerase de amostras sanguíneas bem como o cultivo de células do leite.

Tabela 1. Resultado da avaliação dos animais pelas técnicas de IDGA, PCR de amostras sanguíneas e cultivo celular.

Animal	IDGA	PCR sangue	Cultivo celular
055	Inconclusivo	+	-
060	+	Ø	-

062	+	Ø	-
069	+	Ø	-
071	+	Ø	-
074	+	Ø	-
077	+	Ø	-
078	Inconclusivo	+	+
079	Inconclusivo	+	-
089	Inconclusivo	+	-
091	Inconclusivo	+	-
092	Inconclusivo	+	-
093	+	Ø	-

Ø –Não foi realizada PCR de amostra sanguínea

A confirmação da presença do DNA pró-viral na amostra do cultivo foi realizada pela amplificação do DNA pró-viral de CAEV, através de Nested-PCR que detectou a presença fragmento de do gene *gag* no sobrenadante de cultivo celular na amostra referente ao animal 078 (Fig. 02). Da mesma forma, Gomez-Lucia et al. (2012) e Cardinaux et al. (2013) confirmaram o isolamento viral realizando PCR das amostras de sobrenadante de cultivo celular. Sabe-se que, futuros estudos de caracterização molecular das amostras virais isoladas poderão ajudar a desenvolver testes de diagnósticos mais sensíveis. Esse trabalho permitirá em breve, estudar a caracterização molecular do genoma do vírus isolado, através da análise de seus diferentes genes estruturais, comparar com outras sequencias virais isoladas e identificar cepas regionais circulantes.

O primeiro relato de isolamento de lentivírus de pequenos ruminantes realizado no Brasil ocorreu no Rio Grande do Sul (MOOJEN, et al., 1986). Na região nordeste do país o isolamento viral foi realizado na Bahia (TIGRE et al., 2006), no Ceará (FEITOSA et al., 2010) e no Rio Grande do Norte (FEITOSA et al., 2011). O isolamento de cepas regionais contribui para um melhor conhecimento da diversidade genética desses vírus (FEITOSA et al., 2010).

Sabe-se que o CAEV tem maior probabilidade de estar presente no leite no período próximo a parição, mas este trabalho permite concluir que o CAEV pode ser isolado a partir de amostras de leite caprino em um período de trinta dias após a parição onde o vírus foi isolado por cultivo e por PCR.

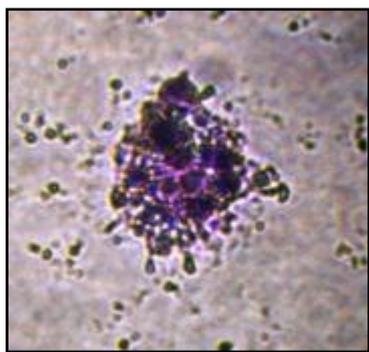


Figura 1 Efeito citopático de formação de sincício em fibroblasto de glândula mamária de animal positivo para infecção por CAEV.



Figura 2. Detecção do DNA pró-viral do CAEV na amostra de sobrenadante de cultivo celular referente ao animal 078. Linha 1 corresponde ao marcador molecular 100pb, linha 2 controle negativo, linha 3 controle positivo e linha 4 amostra positiva.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), suporte na forma de bolsa de Demanda Social, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) suporte em bolsa de produtividade científica e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro de infra-estrutura física e de pesquisa. A Universidade Estadual do Ceará por disponibilizar condições técnica e pessoal para realização deste trabalho. Agradecimentos ao proprietário do capril onde a pesquisa foi desenvolvida que permitiu utilização dos animais sem os quais este estudo não poderia ter sido realizado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSO, J.; GUIGEN, F and LERONDELLE, C. Induction de l'expression du virus de l'arthritis et the l'encephalite de la chèvre chez les animaux séropositifs. *Science Technology Animal Lab.* v 15(2) 101-103, 1990.

BLACKLAWS B.A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 35:259-269, 2012.

BRINKHOF, J. M.; HOUWERS, D. J.; MOLL, L.; DERCKSEN, D.; VAN MAANEN, C. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Veterinary Microbiology*, v.142, p.193-8, 2010.

CALDAS, A.P.F et al - Detecção do provírus da FIV em gatos domésticos pela PCR. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, V 20, N 1, 2000.

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

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; MARTINS, A.; GOUVEIA, A. M. G. Isolamento e identificação pela Imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da Artrite-Encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, n. 3, p. 235-240, 1998.

CASTRO, R.S.; GREENLAND, T.; LEITE, R.C. et al. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to

both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *Journal of General Virology*, v.80, p.1583-1589, 1999.

CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Ruminant Research.*, Amsterdam, v.22, n.1, p.69-77, 1996.

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

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.

FEITOSA, A.L.V.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; PINHEIRO, R.R.; CUNHA, R.M.S. da; LIMA, J.P.M.S.; ANDRIOLO, A.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P. de; PINHEIRO, D.C.S. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminant Research*, v.94, n.1/3, p.205-209, 2010.

FEITOSA, A.L.V.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; PINHEIRO, R.R. ; PINHEIRO, A.A.; AZEVEDO, D.A.A.; ALVES, S.M. Primeiro isolamento de Lentivírus de Pequenos Ruminantes em caprino naturalmente infectado em rebanho do Rio Grande Do Norte, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico.*, São Paulo, v.78, n.4, p.501-505, out./dez., 2011.

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

GOMEZ-LUCIA, E., ET AL. Diversity of caprine arthritis–encephalitis virus promoters isolated from goat milk and passaged in vitro. *The Veterinary Journal*, 2012.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.023>.

HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Veterinaria Scandinavica*, London, v.37, n.1, p.31-39, 1996.

HÖTZEL, I.; BASTOS, E.D.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Caprine arthritisencephalitis virus - isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, V.26, N.11, P.1175-1179, 1993.

ICTV. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em:

< <http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB//00.061.1.06.007.htm>..> Acesso em 12 março 2013.

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

LECHNER, F., VOGT, H.R., SEOW, H.F., BERTONI, G., CHEEVERS, W.P., VON BODUNGEN, U., ZURBRIGGEN, A., PETERHANS, E. Expression of cytokine mRNA in lentivirus-induced arthritis. *American Journal of Pathology*, v.151, p.1053–1065, 1997.

LERONDELLE C. 1988. Mammary infection caused by Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV). *Sci. Vét. Méd. Comp*, v. 90, p.139-143, 1988.

LIMA, P.P; ROCHA, M.A.; STANCEK, D.; GOUVEIA, A.M.G.; OLIVEIRA, G.D.R. Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene *gag*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*., v.56, n.2, p.135-142, 2004.

MAGALHÃES, A.C.M.; *Obtenção higiênica e parâmetros de qualidade do leite de cabra*. Artigo Técnico. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia – Setor de Caprinos. 2005. Disponível em: <http://www.cpd.ufv.br/dzo/caprinos/info_tec.htm> acesso em: 07 de Março de 2013.

MARCHESIN, D.M.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A.P. Caracterização molecular parcial do gene gag de amostras do vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) isoladas de animais naturalmente infectados no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, v.18, p.119-126, 1998.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J.F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*, 259, 67-73, 1999.

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

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *The Journal of General Virology*, v 50, p.69-79, 1980.

NARAYAN O., KENNEDY-STOSKOPF S., SHEFFER D., GRIFFIN D.E. & CLEMENTS J.E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, v. 4, p.67-73, 1983.

NARAYAN, O. e L. C. CORK. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of infectious diseases*, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.

OIE. *Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestre*, 2006. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 12 Março, 2013.

PINHEIRO, R. R. *Vírus de Artrite Encefalite Caprina: Desenvolvimento e 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, UFMG, Belo Horizonte:, 2001.

RAVAZOLLO, A.P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E. et al. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from southern Brazil. *Virus Research.*, v.79, p.117-123, 2001.

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

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A.M. et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, p.347-364, 1990.

SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; BRITO, R.L.L.; RODRIGUES, A.S.; SIDER, L.H.; PAULA, N.R.O.; AVILA, A.A.; CARDOSO, J.F.S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, volume 109, Issues 2–3, 193–198, 2013.

TIGRE, D.M.; CAMPOS, G.S.; SILVIA, I.S. 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 Ciência Médicas e Biológicas*, v.5, n.2, p.124-131, 2006.

6 CONCLUSÃO

O CAEV pode ser isolado a partir de amostras de leite caprino em um período superior a trinta dias da parição, confirmando a importância do leite como meio de transmissão em diferentes etapas da lactação.

7 PERSPECTIVAS

A constatação da presença do Vírus da Artrite Encefalite Caprina em amostra de leite coletada após cerca de um mês da parição, reforça a necessidade de implantação de medidas de prevenção e controle dessa enfermidade no período de pós-parto, conforme indicado entre medidas profiláticas, e no período de lactação subsequente.

A análise e o isolamento do CAEV no leite, no período do pós-parto de cabras, permite acompanhar o período de transmissibilidade, e possibilitam estudos sobre a carga viral, volume e tempo de disseminação do vírus.

O isolamento viral por meio do cultivo celular tem como potencial a realização de estudos mais aprofundados visando o sequenciamento viral, com intuito de identificar e diferenciar as distintas cepas virais circulantes, permitindo um maior conhecimento sobre o vírus que causa enfermidade entre as regiões, bem como sobre o potencial patogênico dessas cepas nos animais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALI AL AHMAD, M.Z., FIENI, F., PELLERIN, J.L., GUIGUEN, F., CHEREL, Y., CHATAGNON, BOUZAR, A.B., CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and genital tract tissues of male goat. *Theriogenology* 69, 473–480. 2008.

ALMEIDA, A.M.R e LIMA, J.A.A. Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia. *Publicação SBF*, Brasília/Fortaleza, 186 p. 2001.

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

ANDRIOLI, A., GOUVEIA, A.M.G., PINHEIRO, R.R., ROCHA, M.A., MARTINS, A.S., SANTOS, D.O. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 23, 420–421, 1999.

ANDRIOLI, A., PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G., SOUZA, K.C., SANTOS, D.O. Controle da Artrite Encefalite Caprina através do uso de Tecnologias Reprodutivas Aplicadas as fêmeas. *Comunicado Técnico*, 86, EMBRAPA-Sobral - CE, 2007.

ARAÚJO, S. A. C. Avaliação *in vitro* da atividade antiviral de produtos sintéticos e naturais contra lentivírus de pequenos ruminantes. 2008. 149 f. *Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)* – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

BANDEIRA, D.A.; CASTRO, R.S.; AZEVEDO, E.O.; MELO, L.S.S.; MELO, C.B. Características de Produção da Caprinocultura Leiteira na Região do Cariri na Paraíba. *Ciência Veterinária dos Trópicos*., Recife-PE, v.10, n.1,p.29-35. 2007.

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

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

BATISTA, M. C. S.; DE CASTRO, R. S.; CARVALHO, F. A. A.; CRUZ, M. S. P.; SILVA, S. M. M. S.; REGO, E. W.; LOPES, J. B. Anticorpos anti-Lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos integrantes de nove municípios Piauienses. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.7, n 2 e 3, p. 75 – 81, 2004.

BLACKLAWS, B. A.; E. BERRIATUA; S. TORSTEINSDOTTIR; N. J. WATT; D. DE ANDRES; D. KLEIN; G. D. HARKISS. Transmission of small ruminant lentiviruses. *Veterinary Microbiology*., v. 101, n. 3, p. 199-208, 2004.

BRANDÃO, S.C.C; MATEDI, M.A.L; CARDOSO, M.G.L.O. Alergia e Intolerância ao Leite de Vaca. *Artigo Acadêmico*, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000. *Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite de cabra. Diário Oficial da União*, Brasília, p. 23, 8 nov. 2000. Seção 1.

BRINKHOF, J. M.; HOUWERS, D. J.; MOLL, L.; DERCKSEN, D.; VAN MAANEN, C. Diagnostic performance of ELISA and PCR in identifying SRLV-infected sheep and goats using serum, plasma and milk samples and in early detection of infection in dairy flocks through bulk milk testing. *Veterinary Microbiology*, v.142, p.193-8, 2010.

BURKALA, E. J.; NARAYANI, I.; HARTANINGSIH, N.; KERTAYADNYA, G.; BERRYMAN, D. I.; WILCOX, G. E. Recombinant Jembrana disease virus proteins as antigens for the detection of antibody to bovine lentiviruses. *Journal of Virological Methods*, v. 74, n. 1, p. 39-46, 1998.

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

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

CASTRO, R.S. Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas. 1998. *Tese (Doutorado)* - Universidade Federal e Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

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

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

CORK, L. C. E.; NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. 1. Persistent viral infection with progressive pathologic changes. [*Laboratory Investigation*](#), v.42, p.596-602, 1980

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

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-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 178, p.713–719, 1981.

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*, 85, 149–152, 2009.

DANTAS, T. V. M.; ARAÚJO, S. A. C.; PINHEIRO, R. R.; ARAGÃO, M. A. C.; SILVA, J. B. A.; RICARTE, A. R. F.; RIBEIRO, A. L.; TEIXEIRA, M. F. S. Desenvolvimento e padronização de um ELISA indireto para Diagnóstico de Maedi Visna em ovinos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 1, p. 181-187, 2008.

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.

FEITOSA, A.L.V.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; PINHEIRO, R.R.; CUNHA, R.M.S. da; LIMA, J.P.M.S.; ANDRIOLO, A.; DANTAS, T.V.M.; MELO, V.S.P. de; PINHEIRO, D.C.S. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminant Research*, v.94, n.1/3, p.205-209, 2010.

FEITOSA, A.L.V.L.; TEIXEIRA, M.F.S.; PINHEIRO, R.R. ; PINHEIRO, A.A.; AZEVEDO, D.A.A.; ALVES, S.M. Primeiro isolamento de Lentivírus de Pequenos Ruminantes em caprino naturalmente infectado em rebanho do Rio Grande Do Norte, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico.*, São Paulo, v.78, n.4, p.501-505, out./dez., 2011.

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

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

GOMEZ-LUCIA, E., ET AL. Diversity of caprine arthritis–encephalitis virus promoters isolated from goat milk and passaged in vitro. *The Veterinary Journal*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.10.023>.

GREGORY, L.; BIRGEL, E.H.J.; LARA, M.C.S.S.H; ANGELINI, M.; ARAÚJO, W.P.; RIZZO, H.; MAIORKA, P.C.; CASTRO, R.S.; KIRALY, A.C.M.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H. Clinical features of indurative mastitis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*. 2 (2), 64-68, 2009.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51:154-163, 2004.

HOLANDA JÚNIOR, E. V. Sistemas de produção de pequenos ruminantes no semi-árido do nordeste do Brasil. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006. 53 p. (*Série Documentos*, 66).

HÖTZEL, I.; BASTOS, E.D.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Caprine arthritisencephalitis virus - isolation and identification in Rio-Grande-do-Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.26, n.11, p.1175-1179, 1993.

HUSO, D.L.; NARAYAN, O.; HART, G.W. Sialic Acids on the Surface of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Define the Biological Properties of the Virus. *Journal of Virology*, v. 62, n.6, p.1974-1980, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Pecuária Municipal, 2010*. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/.../2010/ppm2010.pdf> acesso em: 27 de junho de 2012.

ICTV. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em: <<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/ICTVdB//00.061.1.06.007.htm>.> Acesso em 05 julho 2012.

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

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

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

LECHNER, F., VOGT, H.R., SEOW, H.F., BERTONI, G., CHEEVERS, W.P., VON BODUNGEN, U., ZURBRIGGEN, A., PETERHANS, E. Expression of cytokine mRNA in lentivirus-induced arthritis. *American Journal of Pathology*, v.151, p.1053–1065, 1997.

LERONDELLE C. 1988. Mammary infection caused by Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV). *Sci. Vét. Méd. Comp.*, v. 90, p.139-143, 1988.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas. In: _____ MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. *Imunodiagnóstico em medicina Veterinária*. Campo Grande: EMBRAPA gado de corte (Campo Grande- Mato Grosso do Sul- Brasil), p.145-175, 2001.

MAGALHÃES, A.C.M.; Obtenção higiênica e parâmetros de qualidade do leite de cabra. *Artigo Técnico*. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia – Setor de Caprinos. 2005. Disponível em: <http://www.cpd.ufv.br/dzo/caprinos/info_tec.htm> acesso em: 07 de Agosto de 2012.

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

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 da UFRGS*, v. 14, p.77-78, 1986.

MOTHA, M.X., RALSTON, J.C., 1994. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Veterinary Microbiology*. 38 (4), 359–367.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J.F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virology*, 259, 67-73, 1999.

NARAYAN, O. Lentiviruses are etiological agents of chronic diseases in animals and acquired immunodeficiency syndrome in humans. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v. 54, n. 1, p. 42-48, 1990.

NARAYAN, O. e L. C. CORK. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of infectious diseases.*, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.

NARAYAN O., KENNEDY-STOSKOPF S., SHEFFER D., GRIFFIN D.E. & CLEMENTS J.E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity.*, v. 4, p.67-73, 1983.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *The Journal of General Virology*, v 50, p.69-79, 1980.

OIE. *Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestre*, 2006. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 12 Agosto, 2012.

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

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; ANDRIOLI, A. Perfil de propriedades no estado do Ceará relacionado à presença do lentivírus caprino. *Ciência Animal*, v.14, n.1, p.29-37, 2004.

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

PINHEIRO, R.R.; EGITO, A.S.; SANTA ROSA, J.; PINHEIRO, A.A. Artrite Encefalite Caprina Viral (CAEV). Sobral- CE, EMBRAPA-CNPC, 5p., (*EMBRAPA-CNPC. Comunicado Técnico*,19), 1989.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F.C. *Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas*. São Paulo: Artmed, p. 356, 2005.

REDDY, P. G.; SAPP, W. J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 11, p. 3042-3, 1993.

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

REISCHAK, D. Lentivirus de pequenos ruminantes: imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnosticar sorológico de infecção em ovinos e caprinos. Porto Alegre, 2000. *Dissertação de Mestrado*- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 132p., 2000.

REISCHAK, D.; RAVAZZOLO, A.P.; MOOJEN, V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 22(1):7-12, jan./mar. 2002.

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

ROWE J.D., EAST N. E. & THURMOND M.C. Cohort study of natural transmission and 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.

RUSSO, P. Virus de l'arthrite-encéphalite caprine (CAEV). Brève Revue. *Annales de Recherches Vétérinaires*, Paris, v. 15, n. 1, p. 3 – 6, 1984.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, p.347-64, 1990.

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

SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O.; BRITO, R.L.L.; RODRIGUES, A.S.; SIDER, L.H.; PAULA, N.R.O.; AVILA, A.A.; CARDOSO, J.F.S.; ANDRIOLI, A. Transmission of the caprine arthritis-encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*, volume 109, Issues 2–3, 193–198, 2013.

STÜNZI H., B. H. F.; LE ROY H.L.; LEEMANN, W. Endemische arthritis chronica bei Ziege. *Schweizer Archiv Fürur T-ierärkunden*, p.778-788, 1964.

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

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

ZINK M.C. & JOHNSON L.K. Pathology of lentivirus infections of sheep and goats. *Virus Research*. 32:139-154, 1994.

ANEXO I

AGENDA Manuscrito 036/13

Apagar Mover Spam Ações

Manuscrito 036/13 de Arquivos do I. biologico para você Sex, 15:43

Prezado Autor,
Comunicamos o recebimento do trabalho "**Isolamento do Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em amostra de leite de cabras naturalmente infectadas**" de autoria de Rebeca Cavalcante Marinho, Maria Fátima da Silva Teixeira, Gabrielle Rosembli Martins, Igor Ciriaco Barroso¹, Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹ e Victor Manuel de Lacerda Freitas¹ que será submetido ao Conselho Científico da revista Arquivos do Instituto Biológico.

Informamos que seu trabalho recebeu o número **Arq. 036/13**. Qualquer esclarecimento que desejar solicitar favor informar este número.

Para ciência dos autores, informamos que o trâmite (da entrada ao aceite) de um manuscrito nesta revista está demandando uma média de 12 meses.

Atenciosamente,
Silvia R. Galleti
Editor Chefe

Revista "Arquivos do Instituto Biológico" - www.biologico.sp.gov.br
Editor chefe: Silvia Regina Galleti
arquivos@biologico.sp.gov.br
Instituto Biológico
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252
04014-002 - São Paulo - SP, Brasil

----- Original Message -----
From: Laboratorio Virologia
To: arquivos@biologico.sp.gov.br
Sent: Thursday, May 09, 2013 2:40 PM
Subject: submissão de artigo