

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

Dellane Martins Tigre¹

Gubio Soares Campos²

Silvia Ines Sardi³

Resumo

O vírus da ***Artrite encefalite caprina*** é o agente causal de uma doença progressiva e debilitante em caprinos, em que as células da linhagem monócito/macrófago são as principais hospedeiras do vírus ***in vivo***. Essas células estão presentes no colostro, no leite ou no sangue. Estudos demonstram que a replicação viral é dependente do nível de maturação ou diferenciação da célula monocítica, influenciando na sensibilidade de detecção do vírus. Neste estudo, utilizamos o co-cultivo de monócitos/macrófagos com células de membrana sinovial de cabras, para o isolamento do vírus circulante no campo; a técnica de ***double nested*** PCR (***dn***PCR) dos co-cultivos e sangue, viabilizou a confirmação do isolamento viral, e a detecção direta do vírus no sangue. Através dessa técnica, detectou-se a presença do DNA proviral em animais soronegativos por Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA); esses achados confirmam que o tempo entre o início da infecção e o aparecimento de anticorpos no sangue é variável, facilitando a permanência de animais falsos-negativos no rebanho. Nas amostras processadas, tivemos uma divergência de resultados entre amostras sorologicamente positivas, entretanto, negativas por ***dn***PCR, quando se utilizou a amplificação direta do sangue. Quanto ao cultivo de monócitos/macrófagos ***in vitro*** posterior co-cultivo com células de MSC obteve-se êxito pelo isolamento do vírus em quatro animais, havendo sido um deles soronegativo. O presente estudo demonstra o primeiro isolamento do vírus nos rebanhos do estado da Bahia, além da implementação da técnica de ***dn***PCR, em co-cultivo de células.

Palavras-chave: CAEV- Isolamento; monócito; PCR.

INTRODUÇÃO

O vírus da ***Artrite encefalite caprina*** (CAEV) causa uma doença progressiva e debilitante, caracterizada por artrite, mastite, leucoencefalomielite e pneumonia em caprinos jovens e adultos. O vírus pertencente à família

Retroviridae, gênero ***Lentivirus***, apresenta-se como virions envelopados de 80 a 100nm de diâmetro, com duas moléculas idênticas de RNA. As células da linhagem monócito/macrófago são as principais hospedeiras do

¹ Médica veterinária. Mestre. Programa de Pós-graduação em Imunologia. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia – UFBA. Salvador - BA

² Farmacêutico Bioquímico. Pesquisador. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia – UFBA. Salvador - BA

³ Professora Doutora. Departamento de Biointeração – Setor de Microbiologia. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia - UFBA - BA

Correspondência para / Correspondence to:

Silvia Ines Sardi

Laboratório de Virologia. Departamento de Biointeração

Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia - UFBA

Av. Reitor Miguel Calmon, s/nº - Campus do Canela

40.110-100. Salvador- BA -Brasil

Tel: (71) 3235-0937

E-mail: sissardi@yahoo.com.br

CAEV *in vivo*, e é nessas células que o vírus persiste por toda a vida do animal. Estudos demonstraram que a replicação viral é dependente do nível de maturação e diferenciação da célula monocítica e, presumivelmente, a presença de monócito/macrófagos infectados no colostro, leite, sangue e outras secreções seriam as possíveis fontes de infecção (EAST et al., 1993; PHELPS; SMITH, 1993; MURPHY et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; GUEDES; SOUZA; GOUVEIA, 2001).

A prova utilizada como referência no diagnóstico de CAEV é a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA). Este é um teste sorológico pouco sensível, que não detecta animais com baixo título de anticorpos, facilitando a permanência de animais falso-negativos no rebanho. Atualmente, outros métodos sorológicos mais sensíveis são utilizados, entre eles o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *Western Blotting*. Entretanto, técnicas modernas de biologia molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são importantes ferramentas para o diagnóstico da infecção viral (HARKISS; WATT, 1990).

A PCR é um método de diagnóstico, que combina sensibilidade e especificidade, capaz de identificar animais em estágios recentes de infecção, ou que ainda não soroconverteram. A detecção por PCR do provírus, nas células mononucleares do sangue periférico (CMSP), constitui uma importante alternativa de diagnóstico. Entretanto, segundo Clavijo e Thorsen (1996), quando CMSP são utilizadas diretamente como alvo para a amplificação, a técnica não é suficientemente sensível para a detecção do DNA proviral. Por outro lado, quando as CMSP são cultivadas *in vitro*, é encontrado um maior número de amplificações positivas.

Assim, este trabalho teve como objetivo mostrar que o cultivo *in vitro* das CMSP estimularia o amadurecimento e diferenciação dessas células, melhorando a sensibilidade da PCR e ativando a replicação viral. Essa consequente ativação viral resultou na produção e isolamento de vírus infeccioso nos co-cultivos com monocamadas de células de membrana sinovial de cabra (MSC).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Cabras provenientes de diferentes rebanhos do estado da Bahia foram utilizadas para coletar amostras de sangue (n=38) e soro (n=451).

Detecção sorológica por IDGA

O teste de IDGA para detecção de anticorpos anti-CAEV foi realizado com um "kit" de uso comercial (*Veterinary Diagnostic Technology Inc*), seguindo-se as orientações do fabricante. Esse teste utiliza antígenos específicos do CAEV: a proteína do capsídio ($p28$) e a glicoproteína de superfície ($gp135$).

Isolamento viral

- Cultivo de células de membrana sinovial de cabra (MSC)

Cultivaram-se explantes das membranas sinoviais das articulações intercarpiais de ambos os membros anteriores, de cabras livres do CAEV. As membranas foram seccionadas em pequenos fragmentos e cultivadas em Meio Essencial Mínimo (MEM-G), acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ (ABREU et al., 1998).

- Cultivo de monócitos/macrófagos

O sangue com EDTA 0,5% (n=7) de cabras soropositivas e soronegativas foi processado para a separação das CMSP, utilizando-se um gradiente de Ficoll (Ficoll Paque-Plus, Pharmacia). Brevemente, o sangue (5ml) foi inicialmente diluído (1:2) em solução salina fosfato (PBS) (NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 8mM, KPO₄ H₂ 1,5mM, pH 7,2-7,4). Ao volume de sangue diluído, adicionaram-se 3ml de Ficoll, centrifugando a 1300 g 30 minutos. Após a centrifugação, as CMSP foram lavadas com PBS e tratadas com CINH₄ (0.15M) durante 10 minutos a 37°C, para lisar os eritrócitos contaminantes. Logo após, foram centrifugadas a 500g durante 10 minutos, lavadas em solução de PBS, e o precipitado final com as CMSP, foi ressuspenso em 0,5ml de MEM-G. Esse material foi colocado em microplacas de 24 poços (NUNC), e incubado

durante 1 hora e 30 minutos a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, os poços foram lavados com meio MEM-G, a fim de se obter unicamente os monócitos, pela sua capacidade de aderência. Acrescentou-se meio MEM-G suplementado com 10% de SFB (GIBCO, BRL) e Fungizone (GIBCO, BRL). Esses cultivos de monócitos/macrófagos (mínimo de 600.000 células) foram incubados a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e observados diariamente ao microscópio óptico, durante 15 a 21 dias.

· Co-cultivo de monócito/macrófagos com MSC

Os cultivos de monócito/macrófagos foram coletados, inoculados em monocamadas pré-formadas de células MSC (garrafas cap. 75 cm²) e incubados durante 1 hora e 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, adicionou-se meio MEM-G, com 2% SFB, Hepes 0.01M, e Fungizone (GIBCO, BRL). Os cultivos celulares foram observados ao microscópio diariamente (até 30 dias), a fim de se detectarem alterações compatíveis com o efeito citopático viral (formação de sincícios, fusão celular ou vacuolização).

Amplificação do DNA proviral

· Processamento das amostras

Cultivos de MSC: os co-cultivos com MSC inoculados foram congelados, descongelados e centrifugados a 8.000rpm, por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi armazenado a -70°C, até uma nova passagem em cultura de células, e o pellet celular foi submetido à extração do DNA com o "kit" QIAamp DNA Minikit (*Qiagen Inc*), para a confirmação da presença viral pela técnica de *dn* PCR.

Sangue: as amostras de sangue (n=38), de animais sorologicamente positivos e negativos foram processados para obtenção das CMSP, separando-se as células sanguíneas com gradientes de Ficoll, como descrito anteriormente. O precipitado final, com as CMSP, foi ressuspenso em PBS e congelado a -20°C até o momento da extração do DNA, com o "kit" QIAamp DNA Minikit (*Qiagen Inc*).

Técnica de dn PCR

A reação de *dn* PCR foi realizada, segundo Travassos e colaboradores (1999), utilizando-se dois pares de *primers* para as regiões *pol* e *env*, de 175 pb e 350 pb, respectivamente. Os *primers* externos (P1) foram: 5374 e 5376 para a região *pol*, e 99001 e 5086 para a região *env*. Os *primers* internos (P2) foram: 5375 e 5377 para a região *pol* e 99006 e 99008 para a região *env* (QUADRO 1). As reações de amplificação para ambos os *primers* foram realizadas em um único tubo (*dn* PCR), num termociclador *Gene Amp OCR System 2400* (Perkin Elmer). Para o primeiro ciclo de amplificação, o DNA genômico (20 ug) foi adicionado a Tris HCl (10mM), pH8.3, KCl (50mM), MgCl₂ (2mM), dNTP (200mM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP), P1 (100rM cada) e 2U *Taq* DNA polimerase (GIBCO BRL). O primeiro ciclo da amplificação consistiu de 5 minutos a 95°C e 35 ciclos de 92°C por 40 segundos (desnaturação), 56°C por 50 segundos (anelamento) e 72°C por 1 minuto (extensão). A etapa final de extensão foi de 72°C por 4 minutos. Uma alíquota (10ml) do produto desse primeiro ciclo, foi novamente amplificada em um 2º ciclo, utilizando-se o P2 e mantendo-se as mesmas condições anteriormente descritas, com exceção das etapas de anelamento (60°C por 40 segundos) e extensão (72°C por 50 segundos). Os produtos amplificados foram visualizados em um gel de agarose a 1%, após coloração com Brometo de Etídio (1mg/ml) e transiluminação com luz ultravioleta.

Análise Estatística

Para a análise estatística, foi calculado o índice *kappa* (LILENFELD; STOLEY, 1994).

RESULTADOS

Deteção de anticorpos anti-CAEV

Das 451 amostras analisadas por IDGA, 118 (26,1%) apresentaram soropositividade e 333 (73,9 %) foram soronegativas. Esses resultados foram a base para a escolha dos animais (n=38) sorologicamente positivos e negativos dos experimentos posteriores.

Deteção do provírus em CMSP

Primer	Seqüência 5'→3'	Gene e localização
5374	ACAGAAGAGAAATTTAAAAGG	<i>pol</i> (2236_2255)
5376	ATCATCCATATATATGCCAAATTG	<i>pol</i> (2712_2689)
99001	AGGTAAGTATAAACCCAGGTAAG	<i>env</i> (6122-6145)
5086	ATTCTTATCTTTTATTCCCCC ATA	<i>env</i> (6962-6939)
5375	CAGGGAAGTGGAGAATGTTAAT	<i>pol</i> (2357-2378)
5377	GGTATAGTAAAATATGCATCTCCT	<i>pol</i> (2510-2487)
99006	CATTGGCCTTTATGGCAAATGG	<i>env</i> (6471-6492)
99008	GATGTTTCATAAAGGCCATGCTCTC	<i>env</i> (6812-6789)

Quadro 1 - **Primers** do CAEV utilizados para a técnica de **dnPCR**

Nota: a- baseado em CAEV-Cork (SALTARELLI et al., 1990)

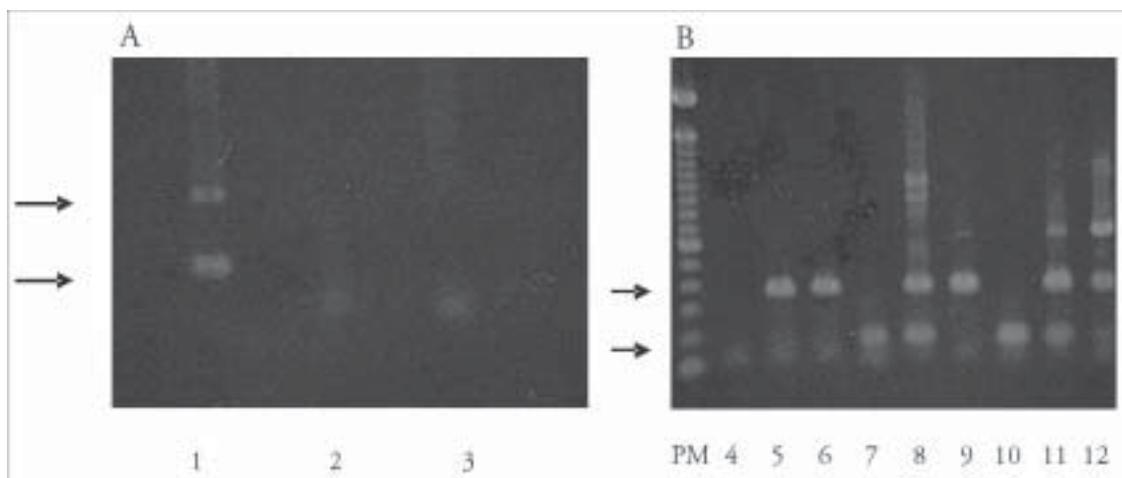


Figura 1 - Padrão de bandas amplificadas por **dnPCR** de amostras de CMSP

Nota: **A** - Linha 1: isolamento viral positivo; Linha 2-3: controle celular negativo;

B - Linha 4: amostra CMSP negativa; Linha 5-12 : amostras CMSP positivas

- As setas indicam a posição das bandas de 350 pb (**env**) e 175 pb (**pol**). PM: marcador de peso molecular

Tabela 1- Comparação dos resultados obtidos através da técnica de **dn PCR** em amostras de sangue (CMSP) e IDGA.

	IDGA		TOTAL
	+	-	
PCR +	12	06	18
PCR -	09	11	20
TOTAL	21	17	38

Nota: PCR-CMSP: sensibilidade: $9/[9+4] \times 100 = 69,2\%$
Kappa: 0,48 (concordância moderada)

Na Tabela 1, demonstra-se o resultado do **dn PCR** direto das CMSP. Observa-se que, de um total de 38 amostras de CMSP, o **dn PCR** detectou a presença do vírus em 18 amostras (68,1%), enquanto que as 20 restantes (31,9 %) foram negativas. Dessas amostras ne-

gativas, 04 amostras foram soropositivas por IDGA, possivelmente, devido à pouca quantidade de CMSP infectadas nesses animais. Entretanto, a técnica de **dn PCR** detectou o vírus em 06 amostras que apresentaram sorologia negativa. A análise estatística demonstrou que, entre os testes de **dn PCR** e IDGA, houve uma concordância moderada (**kappa** = 0,48). Na Figura 1 observa-se o padrão de bandas amplificadas.

Cultivo de monócitos/macrófagos e co-cultivo em MSC

Das amostras de CMSP cultivadas *in vitro* e co-cultivadas com células de MSC (n=7), o vírus foi detectado em 04 amostras (TABELA 2). Na Tabela 2 também se pode observar que

três amostras deram resultados negativos quando usadas as CMSP como alvo direto para *dn* PCR.

Na Figura 2, observa-se o efeito citopático do CAEV nas monocamadas de células de MSC e, na Figura 1, padrão de bandas amplificadas no *dn* PCR, confirmando a presença do vírus. Destaque-se que um dos animais era soronegativo, o que mostra a importância desses portadores sadios do vírus que ainda não soroconverteram.

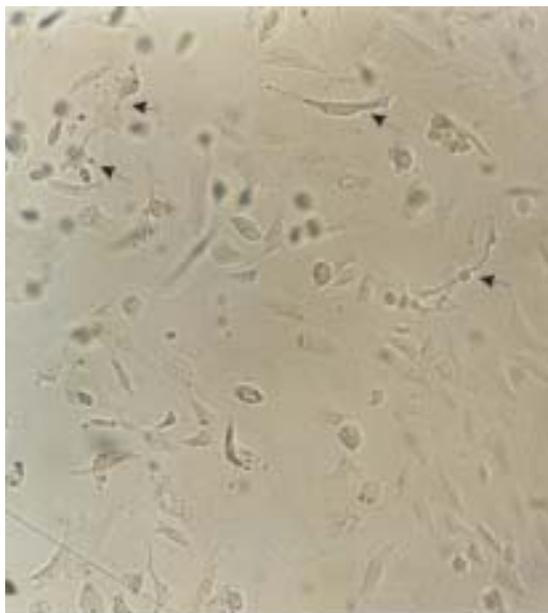


Figura 2 - Isolamento viral a partir do cultivo *in vitro* de monocitos/macrófagos e co-cultivo com células de membrana sinovial de cabra.

Nota: As setas indicam alterações celulares

DISCUSSÃO

O diagnóstico sorológico de animais infectados por CAEV é contestável, considerando-se que alguns animais podem apresentar baixos títulos de anticorpos, soroconversão tardia, ou ainda reações intermitentes de soropositividade e soronegatividade (PHELPS; SMITH, 1993; EAST et al., 1993; CLAVIJO; THORSEN, 1996; HANSON; HYDBRING; OLSSON, 1996). A sorologia por IDGA, apesar de ser uma prova de baixa sensibilidade, é o teste mais amplamente utilizado em animais no diagnóstico de infecções por *Lentivírus* (KNOWLES et al., 1994; ABREU et al., 1998).

Uma vez que a transmissão horizontal do CAEV tem um importante papel na transmissão do vírus, diagnosticar e segregar os animais positivos, pode contribuir para a erradicação do vírus no rebanho.

Na primeira parte deste trabalho, o levantamento sorológico, realizado pela técnica de IDGA, mostrou uma prevalência de 26% de animais soropositivos para CAEV. Esses animais estavam aparentemente sadios e não possuíam sintomatologia evidente. Essa técnica sorológica normalmente, é aplicada para triagem do rebanho, pois permite processar um grande número de amostras e detectar rapidamente os animais portadores do vírus. Entretanto, o diagnóstico sorológico pode complicar-se diante de uma soroconversão tardia, resultando na presença de animais falso-negativos no rebanho.

Quadro 2 - Detecção do vírus através da técnica de *dn* PCR em células da MSC co-cultivadas com macrófagos e diretamente das CMSP.

Animal Numero	Isolamento ^a	PCR-CSMP ^b	IDGA ^c
31	-	+	+
34	+	-	+
39	+	-	+
58	-	+	+
59	-	+	+
60	+	-	+
82	+	+	-

Nota: a - Isolamento viral em cultivo de MSC

b - PCR-CSMP: *dn* PCR com células mononucleares de sangue periférico

c - IDGA: Imunodifusão em gel de agarose com soros caprinos

+ = positivo; - = negativo

Portanto, para identificar precocemente animais infectados, utilizamos a técnica de *dn* PCR em uma das principais fontes de transmissão viral, o sangue. Através dessa técnica, detectou-se, em animais soronegativos, a presença do DNA proviral, o que sugere ser variável o tempo entre o início da infecção e o aparecimento de anticorpos no sangue, dependendo do nível de replicação viral em cada animal. Dessa forma, o uso de uma técnica sorológica de baixa sensibilidade, como a IDGA, dificulta a identificação desses animais (HARKISS; WATT, 1990; BARLOUGH et al., 1994).

Das amostras processadas por ambas as técnicas, tivemos uma divergência de resultados em 9 amostras, que foram sorologicamente positivas, embora fossem negativas por *dn* PCR. A discordância desses resultados pode ser explicada por: (a) baixo número de cópias do DNA proviral integrado às células do sangue; (b) o número de células do sangue infectadas na amostra, insuficiente para a detecção do vírus; e (c) a baixa carga viral no sangue de animais aparentemente saudáveis (RUTKOSKI et al., 2001). Além disso, deve-se considerar que, diferentemente do que ocorre para os outros *Lentivírus* indutores de imunodeficiência, como o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o CAEV não infecta linfócitos e sim monócitos, sendo que esses constituem apenas 10% da população leucocitária total, e somente nessas células seria detectado o provírus integrado (GENDELMAN; NARAYAN; MOLINEAUX, 1985; REDDY; WALTER; HENEIDE, 1993). Sendo assim, duas abordagens complementares poderiam esclarecer esses resultados e a sensibilidade da técnica de PCR pode ser melhorada quando: (a) aumentamos o número de células mononucleares testadas ou (b) pelo culti-

vo *in vitro* dessas células, permitindo o amadurecimento do monocito/macrófago (WAGTER et al., 1998). O volume do sangue utilizado no nosso trabalho foi de 5ml. Portanto, aumentar o volume para 10ml poderia aumentar a sensibilidade da técnica. Entretanto, demonstrouse que o cultivo *in vitro* das CMSP e o posterior co-cultivo com células de MSC melhoraram a detecção do DNA proviral e possibilitaram o isolamento de vírus infeccioso em quatro animais, três deles negativos por *dn* PCR quando se utilizou diretamente as CMSP. Além disso, dos isolamentos realizados, um deles provinha de um animal soronegativo por IDGA, demonstrando que existem animais portadores sadios com carga viral infecciosa.

CONCLUSÕES

No presente estudo, isolamos o CAEV a partir de CMSP co-cultivadas em monocamadas de membrana sinovial caprina. Este é um fato inédito no estado da Bahia, que permitirá analisar futuramente as possíveis diferenças entre essas cepas/isolamentos e a cepa referência CAEV Cork. Também detectou-se o DNA proviral do CAEV através da técnica de *dn* PCR, utilizando-se CMSP diretamente, ou co-cultivadas com células da MSC, mostrando que técnicas de biologia molecular de alta sensibilidade, como a PCR, podem ser de grande valor na identificação de animais infectados e soronegativos, que poderão soroconverter tardiamente.

Nossos resultados demonstram que a PCR representa uma importante ferramenta diagnóstica na identificação precoce de animais infectados porém soronegativos, considerando as condições que aumentam a sensibilidade da técnica para amostras de sangue (CMSP).

Isolation and identification of the caprine arthritis-encephalitis virus from the co-cultivation of peripheral blood mononuclear cells with goat membrane sinovial cells

Abstract

Caprine arthritis encephalitis virus is responsive of a progressive, debilitating disease in goats having in vivo tropism for monocyte/macrophage cell lineage. These cells are present in colostrum, milk or blood.

Studies demonstrate that the viral replication is activated only following differentiation of monocyte to macrophage, which increase the sensibility of viral detection. In our study it was performed the double-nested PCR technique and co-cultivation of monocyte/macrophage with membrane goat sinovial cells to detect the virus in blood, source of viral transmission. Through these methods, it was detected DNA proviral in seronegative goats, confirming that the time among infection and appearance of antibodies is variable facilitating the permanence of false-negative goats. It was observed divergences in the results between serology and PCR techniques, disagreement that is argued above in the work. The co-cultivation of monocyte/macrophage with membrane goat sinovial cells was successful; it was obtained four viral isolament, one of them from seronegative goats. In conclusion, our studies, for the first time isolate the virus circulating in our flocks, implementing an high specificity double-nested PCR technique to identify early viral infection in goats

Keywords: CAEV, isolament, monocyte, PCR

REFERÊNCIAS

- ABREU, S.R.O. et al. Produção de antígeno nucleoproteico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p.57-60, 1998.
- BARLOUGH, J. et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods*, Amsterdam, v.50, n.1/3, p.101-113, 1994.
- CLAVIJO, A.; THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. *Small Rumin. Res.*, Amsterdam, v.22, n.1, p.69-77, 1996.
- EAST, N.E. et al. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Small Rumin. Res.*, Amsterdam, v.10, p.251-262, 1993.
- GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; MOLINEAUX, S. Slow persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophages precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.82, p.7086-7090, 1985.
- GUEDES, M.I.M.C.; SOUZA, J.C.A.; GOUVEIA, A.M.G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.53, n.1, p.15-20, 2001.
- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Acta Vet. Scand.*, London, v.37, n.1, p.31-39, 1996.
- HARKISS, G.D.; WATT, N.J. Lentivirus infections and their detection. *Goat Vet. Soc. J.*, Cambridge, UK, v.11, n.1, p.19-25, 1990.
- KNOWLESS, D.P. et al. Evaluation of agar gel immunodifusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v.32, n.1, p.243-245, 1994.
- LILIENFELD, D.E.; STOLLEY, P.D. *Foundations of epidemiology*. case control studies. 3rd.ed. New York: Oxford University Press, 1994.
- MURPHY, F.A. et al. Retroviridae. In: _____. *Veterinary virology*. 3rd.ed. San Diego: Academic Press, 1999. p.363-389.
- PHELPS, S.L.; SMITH, M.C. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, Schaumburg, v.203, n.12, p.1663-1666, 1993.

- REDDY, P.G.; WALTER, J.S.; HENEIDE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v.31, n.11: p.3042-3043, 1993.
- RIMSTAD, E. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, Schaumburg, v.54, n.11, p.1858-1863, 1993.
- RUTKOSKI, J.K. et al. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia de polimerase com "primers" degenerados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.53, n.6, p.635-640, 2001.
- SALTARELLI, M. et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, New York, v.179, p.347-364, 1990.
- TRAVASSOS, C.E. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rumin. Res.*, Amsterdam, v.32, p.101-106, 1999.
- WAGTER, L.H. et al. PCR detection of lentiviral GAG segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. *Vet. Res. Commun.*, Dordrecht, v.22, n.5, p.355-362, 1998.

Agradecimentos

O autor agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

Recebido em / **Received:** 07/01/2006

Aceito em / **Accepted:** 29/05/2006