

Western Blot no imunodiagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes

Western Blot in Immunodiagnosis of Small Ruminant Lentivirus

Renato Mesquita Peixoto, Ana Lídia Madeira de Sousa, Juscilânia Furtado Araújo & Raymundo Rizaldo Pinheiro

ABSTRACT

Background: Small ruminant lentivirus (SRLV) belong to genus *Lentivirus*, family *Retroviridae*. These viruses cause caprine arthritis encephalitis (CAE) and maedi visna (MV), infectious diseases that cause economic, production, and reproductive losses. There are no effective treatments or vaccines for these diseases. Thus, early detection via serology has great importance for control of SRLV. Therefore, the objective of this review is to demonstrate the potential of the western blot (WB) test as an immunodiagnostic test for SRLV.

Review: In general, immunodiagnosis of SRLV is performed via agar gel immunodiffusion (AGID) and indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which can detect antibodies in several different biological samples but is used preferably with serum and blood plasma. However, WB has demonstrated efficacy in the early diagnosis of immunoglobulins against SRLV, presenting higher sensitivity and specificity than the serological tests usually used, because this technique can detect antibodies at a dilution as much as 256 times greater than that of AGID and 32 times greater than that of ELISA. SRLV infection and consequent immunological activation result in the induction of cellular and humoral responses. Additionally, around the third week, production of antibodies directed mainly toward viral capsid proteins (p25 and p28) occurs. After the fifth week, production of immunoglobulins directed toward other viral proteins occurs. Because of the persistence of SRLV infection, serology is considered to be the most practical means to diagnosis. Each serological test has a percentage specificity and distinct sensitivity, as well as advantages and disadvantages in its applicability. It should be noted that there is no gold standard test for diagnosis of SRLV infection. Moreover, SRLV are characterized by escape mechanisms such as genetic diversity, mutagenic potential, viral intermittence, and the process of compartmentalization, which make immunodiagnosis more difficult. In addition, positive animals tend to present unstable levels of antibodies over weeks, months, and even years. In this context, WB, with early antibody detection, has been proven to be a refined and more accurate technique than other immunodiagnostic tests for SRLV. WB allows the simultaneous resolution of several immunogenic antigens present in a sample, and this feature provides it with greater reliability, differentiates it from other immunological methods, and accredits it as a test of wide applicability. Epidemiological and immunological dynamics studies often use WB in the immunodynamic diagnosis of SRLV. Serum, blood plasma, and seminal plasma are typical biological materials used in the serological diagnosis of SRLV with WB, expanding its potential as an immunodiagnosis method.

Conclusion: WB is the most accurate serological technique for SRLV. It is more capable of accurate diagnosis because the genetic diversity that characterizes such lentiviruses and their various immune system escape mechanisms routinely hinder traditional diagnosis. Additionally, this test has been used widely in studies of SRLV for various purposes, but mainly in studies of epidemiological and immunological dynamics, using serum, blood plasma, or seminal plasma. However, independently of the biological sample tested, WB maintains high sensitivity and precision in immunodiagnosis, making it a refined and valid technique for SRLV control programs.

Keywords: serological diagnosis, immunoglobulins, lentiviruses, ovinecaprineculture.

Descritores: diagnóstico sorológico, imunoglobulinas, lentivirose, ovinocaprinocultura.

DOI: 10.22456/1679-9216.109822

Received: 8 November 2020

Accepted: 10 December 2020

Published: 15 January 2021

Laboratório de Virologia, EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPQ), Sobral, CE, Brazil. CORRESPONDENCE: R.M. Peixoto [renatomiraima@gmail.com].
Laboratório de Virologia - EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPQ). Zona Rural. CEP 62010-970 Sobral, CE, Brazil.

I. INTRODUÇÃO

II. LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES: CARACTERÍSTICAS GERAIS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

III. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

IV. WESTERN BLOT: CONCEITOS BÁSICOS E APLICAÇÕES

V. WESTERN BLOT NO IMUNODIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

I. INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPRs) compreendem o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) e o vírus da Maedi-Visna (MVV), sendo também conhecidos como lentivírus caprino e lentivírus ovino, respectivamente [44]. Outrora, eram considerados patógenos espécie-específicos, porém estudos evidenciaram que são capazes de proporcionar infecção cruzada entre as espécies [76,78].

Até o presente momento não há um tratamento eficaz a ser preconizado, e nenhuma vacina sendo comercializada para combater a ação do vírus [81]. Ademais, frequentemente há a ocorrência de animais sem sintomatologia clínica (assintomáticos), os quais são fontes de infecção [29]. Assim, recomenda-se que a identificação dos animais infectados não seja baseada apenas nos sinais clínicos, os quais podem ser similares a de outras enfermidades, mas também através de testes laboratoriais [50]. Desse modo, o diagnóstico precoce dos animais passa a ser uma ferramenta de grande valia em programas de controle, com fins de identificar os animais infectados, retirá-los do rebanho (incluindo aqueles assintomáticos), e conseqüentemente evitar a propagação viral.

A Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) indireto, são os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para LVPRs [35]. No entanto, o Western Blot (WB), tem sido utilizado e se mostrado mais eficaz na detecção de anticorpos contra LVPRs [12,23,61] devido sua alta sensibilidade e especificidade. Portanto, o objetivo da presente revisão é demonstrar o potencial do Western Blot como teste de imunodiagnóstico de LVPRs.

II. LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES: CARACTERÍSTICAS GERAIS E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A artrite encefalite caprina (CAE) e a maedi-visna (MV) são doenças infectocontagiosas causadas

pelos LVPRs, retrovírus não oncogênicos, responsáveis por acarretar perdas produtivas e reprodutivas, e conseqüentemente econômicas [10]. Estruturalmente os lentivírus apresentam uma forma esférica, medindo de 80 a 100 nm envelopado por uma bicamada de lipídeos (envelope), a qual surge da membrana celular da célula hospedeira [66]. No envelope estão contidas as glicoproteínas de superfície e transmembranar, sendo as principais, gp135 e gp38 respectivamente, que juntamente com a p25 (no caso do MVV) e p28 (CAEV), presente no capsídeo determinam a produção de anticorpos pelo organismo do animal infectado [55].

Os LVPRs infectam ovinos e caprinos independente da raça, sexo, idade ou estagio produtivo, e o período de incubação varia de meses a anos [24]. Além de ocasionar doenças inflamatórias de caráter progressivo e lento, afetam preferencialmente os pulmões, sistemas nervoso, articulações e glândula mamária [34]. A transmissão ocorre através de distintas formas: ingestão de leite e colostro contaminado [53]; presença do vírus no sêmen de reprodutores infectados [7,73]; pelo contato direto entre animais, através de fezes, saliva e secreções respiratórias contendo partículas virais [57,74]; e em menor escala, a transmissão intrauterina, que ocorre no período da gestação [9,30,62].

Dentre os inúmeros vírus existentes, os retrovírus se destacam por seu potencial de inserir genoma viral no organismo hospedeiro, sendo essa etapa essencial para o processo de replicação viral que ocorre em células do sistema imunológico [82]. As interações com alto padrão de complexidade entre proteínas caracterizam as etapas iniciais no processo de infecção, pois a glicoproteína de superfície (gp135) se liga ao seu receptor proteico situado na célula hospedeira [69]. Existe um tropismo pelas células do sistema monocítico-fagocitário [75], as quais estão sujeitas a expressarem produtos virais e efeitos citopáticos [40], sendo os macrófagos preferencialmente infectados, o que facilita sua disseminação pelo organismo animal [16]. No sistema monocítico-fagocitário a contaminação desencadeia uma infecção estável, sem lise celular, e a maturação celular determina a expressão genômica viral [81].

Logo que ocorre a incorporação das membranas virais e celulares o capsídeo viral é movido para o citoplasma, onde por meio de reações envolvendo mudanças de potencial hidrogeniônico (pH) há a liberação do seu conteúdo causando a ativação da transcriptase reversa, e posterior transcrição do genoma

viral, finalizando com a integração do DNA pró-viral na célula hospedeira por ação da enzima integrase, e com isso ocorre o estabelecimento da infecção [69]. A ocorrência de uma infecção persistente se dá por vários mecanismos que evolutivamente os lentivírus foram desenvolvendo, como por exemplo, à presença de provírus junto ao genoma dos monócitos, o potencial do vírus de infectar macrófagos sem causar sua lise e a redução do processo replicativo em função da produção de interferon [18].

No entanto, mesmo havendo a replicação viral essa pode ocorrer de forma restrita, propiciando que o vírus permaneça latente nos monócitos dos hospedeiros sem ser detectado pelo sistema imune [47]. Desse modo, animais infectados podem não manifestar os sintomas característicos da enfermidade, se mantendo assintomáticos por longo tempo, e vindo futuramente a expressar a forma clínica da enfermidade, em geral, quando oriundo de rebanhos com alta soropositividade. Todavia, a patogenicidade da enfermidade, como a restrição do processo replicativo e a latência viral, pode determinar a soroconversão, de forma tardia ou não, de um animal infectado, podendo até mesmo o vírus ficar oculto, sem ativar o sistema imunológico [16,60].

No entanto, quando há infecção por LVPRs, e consequente ativação imunológica, verifica-se uma indução de respostas, tanto a nível celular como a nível humoral [14,20]. Adicionalmente, em torno da terceira semana, em geral, é onde ocorre a produção de anticorpos ocasionada principalmente, pelas proteínas do capsídeo viral, e após a quinta semana ocorre a produção de imunoglobulinas direcionadas a outras proteínas virais [21].

III. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

Em virtude do caráter de infecção persistente por LVPRs, a sorologia se credencia, geralmente, como o meio de maior praticidade a ser utilizado no diagnóstico, uma vez que a detecção de anticorpos demonstra de forma indireta a ocorrência da infecção do animal [18].

Assim, a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), o ELISA indireto, e recentemente, o Western Blot (WB) são os testes sorológicos aplicados no imunodiagnóstico de LVPRs [61]. Cada um desses apresenta percentual de especificidade e sensibilidade distinto, bem como vantagens e desvantagens quando aplicados.

Ressalta-se que não há um teste padrão de referência para o diagnóstico da infecção por LVPRs [52].

Tradicionalmente, observa-se que a IDGA é a técnica sorológica mais usual no diagnóstico de LVPRs, por sua praticidade, baixo custo e alta especificidade [83]. Esse teste baseia-se na formação de complexos antígeno-anticorpo, insolubilizados e precipitados em uma base sólida, com desenvolvimento da linha de precipitação, a qual se torna visível entre os orifícios onde se alcança o platô da interação antígeno e anticorpo [61].

A IDGA, em geral, é recomendada para ser um teste de triagem a ser aplicado quando não há nenhum relato da ocorrência de LVPRs em um determinado rebanho e/ou região [52]. Todavia, esse teste apresenta como uma das principais desvantagens o fato de somente detectar altos níveis de imunoglobulinas, e isso eleva a possibilidade de ocorrer falsos-negativos no rebanho [41]. Ademais, muitos estudos já evidenciaram que o mesmo apresenta baixa sensibilidade [5,12,23,50].

O ELISA indireto envolve uso de anticorpos primários e secundários, e sua especificidade depende da qualidade do antígeno que se dissolve na placa [39]. Essa técnica permite o processamento de grande número de amostras, fato que otimiza o diagnóstico [61]. Embora seja mais sensível que a IDGA, com capacidade de detectar um maior número de animais positivos [12,45], a necessidade de antígenos mais purificados e o alto custo estão entre as principais desvantagens da técnica [51].

Já o Western Blot é uma técnica mais refinada, com capacidade de detecção precoce de anticorpos [8]. A técnica se baseia na realização de uma eletroforese para separação das proteínas de interesse, com posterior transferência desse extrato proteico para uma membrana de nitrocelulose, vindo o complexo antígeno-anticorpo ser visualizado pela aplicação de conjugado enzimático, com reação de substrato e enzima, dando cor à reação. Embora seja uma técnica que necessite de estrutura laboratorial e seja de alto custo, apresenta altos níveis de sensibilidade e especificidade frente aos demais testes sorológicos [12,61]. O WB apresenta potencial de detecção de anticorpos em uma diluição de até 128 vezes maior que a IDGA, e 16 vezes maior que o ELISA, sendo assim uma importante ferramenta no diagnóstico precoce de anticorpos em infecções por LVPRs [52].

Todavia, é importante mencionar que alguns mecanismos de escapes desenvolvidos pelos LVPRs como a diversidade genética e potencial de mutação [56], a intermitência viral [12], e o processo de compartimentalização [59] tem dificultado cada vez mais o diagnóstico sorológico dos LVPRs. Além disso, animais comprovadamente positivos tendem a apresentar níveis instáveis de anticorpos ao longo de semanas, meses e até anos [54]. Em função disso, inúmeros trabalhos têm recomendado a associação de técnicas diretas (moleculares) e indiretas (sorológicas) de diagnóstico, a fim de se ter precisão no resultado [9,12,22,30,46,48].

IV. WESTERN BLOT: CONCEITOS BÁSICOS E APLICAÇÕES

O Western Blot, Imunoblotting ou Blotting de proteínas é uma técnica imunoenzimática de detecção de proteínas, empregada em estudos bioquímicos e imunológicos, e como ferramenta de estudo de expressão gênica e biologia molecular [31,32]. Esta técnica molecular, outrora, já foi utilizada, com maior frequência, em estudos com amostras de DNA e RNA, sendo denominadas de Southern Blotting e Northern Blotting, respectivamente [32,33]. Posteriormente, adequou-se a técnica aos métodos até hoje utilizados, contendo a eletroforese em gel de poliacrilamida com uso do dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), a transferência ativa ou passiva das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (MN) e a reação imunoenzimática [17].

Na eletroforese as proteínas podem ser separadas por ponto isoelétrico, peso molecular, carga elétrica ou uma combinação destes [15,33]. O tipo mais comum utilizado no WB, é a SDS-PAGE, em que se faz uso de um detergente no gel de poliacrilamida. O SDS, desnatura e carrega negativamente as proteínas promovendo a separação somente pelo peso molecular [33]. Após a separação das proteínas, estas são transferidas (Blotting) para uma membrana feita de nitrocelulose, polivinilideno difluoreto, papel ativado ou nylon ativado [31]. A MN é a mais utilizada, e a transferência proteica pode ocorrer de várias maneiras [31,32], dentre elas, a ativa (Eletroblotting), na qual é utilizada uma corrente elétrica para mover as proteínas do gel para a MN [33]. Outra forma de transferência proteica entre gel e MN é a passiva, em que ocorre a pressão física, por meio de pesos de aproximadamente 2 kg durante 72 horas [23]. Para o diagnóstico dos

LVPRs são utilizadas ambas formas de transferências proteicas: a forma passiva [23,71] e por meio de Eletroblotting [37,61,73].

A reação imunoenzimática é utilizada para detecção de proteínas imunogênicas de importância para o diagnóstico viral. Essas proteínas imunogênicas, são provenientes de genes que são de suma importância no diagnóstico molecular [11,26].

A reação imunoenzimática ocorre por meio da interação entre as proteínas imunogênicas, ou antígenos (Ag) e as proteínas antigênicas ou anticorpos (Ac) formando um imunocomplexo (Figura 1). Após a aderência do Ag à MN, esta precisa ser bloqueada. Como a ligação não específica de anticorpos à membrana é prejudicial para a especificidade e sensibilidade do ensaio, é essencial “bloquear” os espaços ainda não ocupados por proteínas. Posteriormente, é adicionado o Ac primário (amostra de soro), que se ligará ao antígeno presente na membrana. O Ac secundário (conjugado) é adicionado posteriormente, este componente trata-se de um anti-IgG, ligado a uma enzima (peroxidase de rábano), que reconhece o Ac primário. Já o processo de revelação geralmente ocorre pela ligação química da peroxidase com um revelador (Substrato), gerando uma reação de quimioluminescência [43].

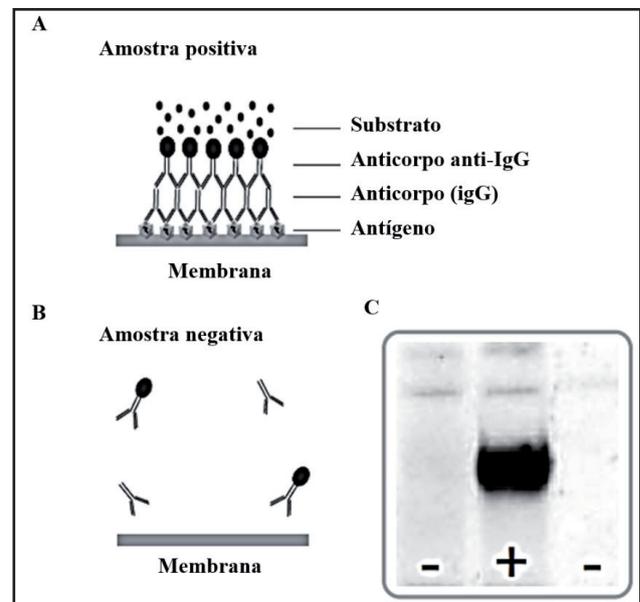


Figura 1. Processo de reação imunoenzimática ocorrida no teste de Western Blot. A- Amostra positiva com reação enzimática completa com formação do complexo Antígeno+Anticorpo+Anti-IgG+Substrato em membrana de nitrocelulose. B- Amostra negativa, sem reação enzimática em membrana de nitrocelulose. C- Reação colorimétrica de amostra positiva e negativa em membrana de nitrocelulose [Fonte: E.F. Flores [27] com adaptações].

V. WESTERN BLOT NO IMUNODIAGNÓSTICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

O Western Blot (WB) dentre os testes sorológicos têm se mostrado como uma ferramenta valiosa no imunodiagnóstico de LVPRs. A técnica tem apresentado resultados eficazes, exercendo detecção precisa de animais positivos (especificidade). E, ainda com capacidade de detecção precoce de anticorpos contra o vírus com possibilidades reduzidas de ocorrência de resultados falsos-negativos (boa sensibilidade) ao ser comparado com os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde [52].

Em função dessas características, a técnica tem sido amplamente empregada no imunodiagnóstico de LVPRs, com diversas finalidades, mas principalmente em pesquisas de caráter epidemiológico e dinâmica imunológica. Na Tabela 1 podemos visualizar a aplicabilidade do WB em vários estudos com relação a infecções por LVPRs.

Com o desenvolvimento e uso do Western Blot, tornou-se possível o imunodiagnóstico de uma vasta lista de doenças infecciosas, tanto em animais como também em seres humanos, incluindo desde o diagnóstico de encefalopatias espongiiformes transmissíveis (EETs) acarretadas por príons [13,42], passando pelo diagnóstico da leishmaniose visceral americana (LVA) [70] e infecções micoplasmáticas [6].

O WB permite a detecção simultânea de várias proteínas antigênicas presentes em uma amostra biológica, sendo que essa característica é que lhe atribui maior confiabilidade. Esse fato o diferencia dos demais métodos imunológicos de rotina para o diagnóstico dos LVPRs, o credenciando como uma técnica valiosa, e de ampla aplicabilidade [31].

O uso dessa técnica no imunodiagnóstico de LVPRs surgiu a partir do momento em que se constatou a carência por um teste que permitisse um resultado mais preciso, aliando altos índices de sensibilidade e especificidade. Associado a isso, a eficácia que o mesmo apresenta frente a outros testes sorológicos, permite otimizar e realizar estratégias de controle, visando reduzir os impactos produtivos, reprodutivos e econômicos que são ocasionadas com o estabelecimento desses agentes virais em um rebanho [10].

Inúmeras vantagens são atribuídas ao WB, tais como: potencial de obtenção de duas cópias a partir de um mesmo gel; facilidade de manuseio das membranas úmidas; acessibilidade das proteínas existentes na membrana de modo uniforme a diferentes ligantes; necessidade de reduzidas quantidades de reagentes; os padrões a serem transferidos permite ser armazenados por um longo período; e uma mesma transferência de

proteínas possibilita várias aplicações, permitindo ser usado em diversas análises sucessivas [31,43].

Frequentemente o material utilizado nos testes sorológicos das lentivirose de pequenos ruminantes ou de qualquer outra enfermidade, é o soro sanguíneo, obtido a partir da centrifugação do sangue coletado do animal a ser avaliado. No entanto, em virtude da detecção do vírus em outros fluidos corporais, como, sêmen [7,29,36]; fluido uterino [19]; soro fetal [38]; saliva [75]; e leite [36], em ausência de sintomatologia, e a compartimentalização viral [59] são fatores que tem incentivado a adaptação e uso da técnica em outros tipos de amostras biológicas. Assim, amostras de plasma sanguíneo [12], e plasma seminal [49], já têm sido alvo de estudos visando a detecção de anticorpos em animais potencialmente infectados por LVPRs.

Na literatura o primeiro trabalho que se têm relatos sobre a utilização de WB em amostras de plasma seminal visava avaliar o efeito do CAEV no sistema reprodutor de machos caprinos [65]. No referido estudo, foi evidenciado que a detecção de anticorpos no fluido seminal via WB já exercia enorme possibilidade de detectar reprodutores com potencial de transmissão da doença, sendo de grande valia principalmente em situações de importação de sêmen, onde não se tem como realizar a avaliação direta do animal. Com base nessas primeiras evidências os autores procuraram padronizar a técnica para o diagnóstico de lentivirose através da detecção de anticorpos anti-LVPRs no fluido seminal, onde concluíram que o plasma seminal pode ser usado com segurança para detectar infecções causadas por lentivírus [58].

Ademais, posteriormente demonstrou-se que amostras biológicas distintas, provenientes de um mesmo animal podem resultar em resultados de WB distintos, vindo em determinados momentos, ocorrer a detecção de imunoglobulinas em apenas um tipo de fluido corporal, em ambos ou ainda em nenhum [49]. Essa ocorrência atribui-se justamente aos mecanismos de escape viral (intermitência e compartimentalização), que tem induzido cada vez mais o aprimoramento dos métodos de diagnóstico e dos programas de controle.

Adicionalmente, a utilização de plasma sanguíneo no WB possibilitou detectar satisfatoriamente os animais positivos para LVPRs, e a técnica permaneceu ainda com sensibilidade maior que a IDGA, mesmo não sendo o soro sanguíneo a amostra a ser testada [12].

Nesse contexto, o uso do WB utilizando distintas amostras biológicas é passível de uso, e consequentemente expande o potencial do mesmo como método de imunodiagnóstico.

Tabela 1. Aplicabilidade do Western Blot (WB) no imunodiagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPRs).

Amostra	Espécie Animal	Tipo de Pesquisa	Local do Estudo	Autores/Ano
Soro Sanguíneo e Plasma Seminal	Caprinos	Dinâmica Imunológica	México	Rodríguez <i>et al.</i> 2005 [65]
Soro Sanguíneo e Plasma Seminal	Caprinos	Análise Comparativa e Padronização de Técnica	Ceará/Brasil	Andioli <i>et al.</i> 2012 [8]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Análise Comparativa	Ceará/Brasil	Pinheiro <i>et al.</i> 2012 [52]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Padronização da Técnica	Ceará/Brasil	Rodrigues <i>et al.</i> 2014 [61]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Estudo Epidemiológico	Ceará, Rio Grande do Norte e Sergipe/Brasil	Santos, 2014 [68]
Soro Sanguíneo	Ovinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Souza <i>et al.</i> 2014 [77]
Soro Sanguíneo e Plasma Seminal	Caprinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Peixoto, 2014 [49]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Alves, 2015 [3]
Soro Sanguíneo	Caprinos e Ovinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Souza <i>et al.</i> 2015 [78]
Soro Sanguíneo	Caprinos e Ovinos	Estudo Epidemiológico	Pernambuco/Brasil	Alves <i>et al.</i> 2017 [2]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Estudo Epidemiológico	Suíça	Thomann <i>et al.</i> 2017 [80]
Soro Sanguíneo	Ovinos	Estudo Epidemiológico	Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Sergipe/Brasil	Alves <i>et al.</i> 2018 [5]
Soro Sanguíneo	Ovinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Lima <i>et al.</i> 2018 [37]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Estudo de Coinfecção e Epidemiológico	Ceará/Brasil	Peixoto <i>et al.</i> 2018 [50]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Avaliação de Programa de Controle	Ceará/Brasil	Rodrigues <i>et al.</i> 2018 [63]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Rodrigues <i>et al.</i> 2018 [64]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Sousa <i>et al.</i> 2018 [71]
Soro Sanguíneo	Caprinos e Ovinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Souza <i>et al.</i> 2018 [79]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Alves, 2019 [4]
Plasma Sanguíneo	Caprinos	Análise Comparativa	Brasil	Azevedo <i>et al.</i> 2019 [12]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Avaliação de Programa de Controle	Suíça	De Martín <i>et al.</i> 2019 [25]
Soro Sanguíneo e Plasma Seminal	Caprinos	Estudo Proteômico	Ceará/Brasil	Santos <i>et al.</i> 2019 [67]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Estudo Epidemiológico	Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe/Brasil	Sousa <i>et al.</i> 2019 [72]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Avaliação de Programa de Controle	São Paulo/Brasil	Alcindo <i>et al.</i> 2020 [1]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Dinâmica Imunológica	Ceará/Brasil	Araújo <i>et al.</i> 2020 [9]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Estudo de Coinfecção e Epidemiológico	Rio Grande do Norte/Brasil	Damasceno <i>et al.</i> 2020 [23]
Soro Sanguíneo	Caprinos	Estudo Proteômico	Ceará/Brasil	Galiza <i>et al.</i> 2020 [28]

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O WB é uma técnica sorológica de maior precisão em relação às demais existentes para LVPRs, sendo capaz de efetuar um melhor diagnóstico, uma vez que a diversidade genética que caracteriza os lentivírus, e seus diversos mecanismos de escape (mutação, compartimentalização e intermitência viral) do sistema imunológico tem dificultado rotineiramente o diagnóstico sorológico. Adicionalmente, esse teste tem sido amplamente adotado em pesquisas de LVPRs com distintas finalidades, mas principalmente em estudos epidemiológicos e de dinâmica imunológica, com a

amostra teste podendo ser soro ou plasma sanguíneo, ou plasma seminal. Independente da amostra biológica testada, o WB mantém sua alta sensibilidade no imunodiagnóstico, sendo uma técnica refinada e válida para programas de controle de LVPRs.

Acknowledgments. To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) for the scholarships of R.M. Peixoto.

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

REFERENCES

- 1 Alcindo J.F., Simões S.V.B., Pinheiro R.R., Peixoto R.M., Andrioli A., Schultz E.B. & Feitosa L.F. 2020. Efficacy of measures to control caprine arthritis-encephalitis in dairy herds with high clinical and serological prevalence. *Semina Ciências Agrárias*. 41(5): 2179-2194.
- 2 Alves J.R.A., Limeira C.H., Lima G.M.S., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Santos V.W.S., Azevedo S.S. & Alves C.J. 2017. Epidemiological characterization and risk factors associated with lentiviral infection of small ruminants at animal fairs in the semiarid Sertão region of Pernambuco, Brazilian semiarid. *Semina Ciências Agrárias*. 36(4): 1875-1886.
- 3 Alves R.P.A. 2015. Artrite encefalite caprina: comparação entre técnicas diagnósticas e estudo das transmissões horizontal e vertical entre animais soronegativos. 122f. Teresina, PI. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.
- 4 Alves R.P.A. 2019. Soroconversão e controle de infecção do lentivírus caprino. 121f. Teresina, PI. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.
- 5 Alves S.M., Teixeira M.F.S., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Lima A.M.C., Farias D.A., Santos V.W.S., Azevedo D.A.A., Martins G.R. & Aguiar T.D.F. 2018. Seroepidemiological study of maedi-visna in sheep in Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, and Sergipe States. *Semina Ciências Agrárias*. 39(5): 2017-2028.
- 6 Andersson A.M., Aspán A., Wisselink H.J., Smid B., Ridley A., Pelkonen S., Autio T., Lauritsen K.T., Kenso J., Gaurivaud P. & Tardy F. 2019. A European inter-laboratory trial to evaluate the performance of three serological methods for diagnosis of *Mycoplasma bovis* infection in cattle using latent class analysis. *BMC Veterinary Research*. 15(1): 369.
- 7 Andrioli A., Gouveia A.M.G., Martins A.S., Pinheiro R.R. & Santos D.O. 2006. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41(8): 1313-1319.
- 8 Andrioli A., Abreu D.A., Pinheiro R.R., Sider L.H., Rodrigues A.S., Brito R.L.L., Souza K.C. & Santos V.W.S. 2012. *Técnica de Western Blot para detecção de anticorpos antivírus da Artrite Encefalite Caprina no plasma seminal*. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 6p.
- 9 Araújo J.F., Andrioli A., Pinheiro R.R., Sider L.H., Sousa A.L.M., Azevedo D.A.A., Peixoto R.M., Lima A.M.C., Damasceno E.M., Souza S.C.R. & Teixeira M.F.S. 2020. Vertical transmissibility of small ruminant lentivirus. *PLoS One*. 15(11): e0239916.
- 10 Azevedo D.A.A., Santos V.W.S., Sousa A.L.M., Peixoto R.M., Pinheiro R.R., Andrioli A. & Teixeira M.F.S. 2017. Small ruminant lentiviruses: economic and productive losses, consequences of the disease. *Arquivos do Instituto Biológico*. 84: e0552016.
- 11 Azevedo D.A.A., Monteiro J.P., Pinheiro R.R., Mudadu M.A., Andrioli A., Araújo J.F., Sousa A.L.M., Sider L.H., Peixoto R.M. & Teixeira M.F.S. 2019. Molecular characterization of circulating strains of small ruminant lentiviruses in Brazil based on complete *gag* and *pol* genes. *Small Ruminant Research*. 177: 160-166.
- 12 Azevedo D.A.A., Pinheiro R.R., Santos V.W.S., Damasceno E.M., Sousa A.L.M., Araújo J.F., Andrioli A., Sider L.H., Peixoto R.M. & Teixeira M.F.S. 2019. Comparação de testes sorológicos e molecular para diagnóstico da artrite encefalite caprina e avaliação clínica da glândula mamária de caprinos leiteiros infectados. *Acta Scientiae Veterinariae*. 47: e1668.

- 13 Baiardi S., Redaelli V., Ripellino P., Rossi M., Franceschini A., Moggio M., Sola P., Ladogana A., Fociani P., Magherini A., Capellari S., Giese A., Caughey B., Caroppo P. & Parchi P. 2019. Prion-related peripheral neuropathy in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 90(4): 424-427.
- 14 Bertoni G., Zahno M.L., Zanoni R., Vogt H.R., Peterhans E., Ruff G., Cheevers W.P., Sonigo P. & Pancino G. 1994. Antibody reactivity to the immuno-dominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *Journal of Virology*. 68(11): 7139-7147.
- 15 Bezerra Júnior R.Q., Eloy A.M.X., Furtado J.R., Pinheiro R.R., Andrioli A., Moreno F.B., Lobo M.D.P., Monteiro-Moreira A.C.O., Moreira R.A., Pinto T.M.F. & Teixeira M.F.S. 2017. A panel of protein candidates for comprehensive study of Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) infection. *Tropical Animal Health and Production*. 50(1): 43-48.
- 16 Blacklaws B.A. 2012. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis vírus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 35(3): 259-269.
- 17 Burnette W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112(2): 195-203.
- 18 Callado A.K.C., Castro R.S. & Teixeira M.S.A.S. 2001. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 21(3): 21-87.
- 19 Cavalcante F.R.A., Andrioli A., Pinheiro R.R., Souza K.C., Veras A.K.A, Lopes T.A., Sousa S.D. & Silva P.A.F. 2013. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina por nested PCR e nested RT-PCR em ovócitos e fluido uterino. *Arquivos do Instituto Biológico*. 80(4): 381-386.
- 20 Cheevers W., McGuire T.C., Norton L.K., Cordery-Cotter R. & Knowles D.P. 1993. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. *Virology*. 196(2): 835-839.
- 21 Concha-Bermejillo A., Brodie S.J., Magnus-Corral S., Bowen R.A. & De Martini J.C. 1995. Pathologic and serological responses of isogenic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 8(2): 116-123.
- 22 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.KP., Pinheiro R.R. & Andrioli A. 2009. Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) detection in semen of endangered goat breeds by nested polymerase chain reaction. *Small Ruminant Research*. 85(2-3): 149-152.
- 23 Damasceno E.M., Pinheiro R.R., Andrioli A., Alves F.S.F., Lima A.M.C., Peixoto R.M., Araújo J.F., Damasceno M.S. & Brandão I.S. 2020. Seroprevalence and associated risk factors of *Mycoplasma agalactiae* and investigation of coinfection with the caprine lentivirus in Rio Grande do Norte, Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 52(4): 2111-2117.
- 24 Dawson M. 1989. The Caprine Arthritis-Encephalitis syndrome. *Veterinary Annual*. 29: 98-102.
- 25 De Martín E., Golomingi A., Zahno M.L., Cachim J., Di Labio E., Perler L., Abril C., Zanoni R. & Bertoni G. 2019. Diagnostic response to a cross-border challenge for the Swiss caprine arthritis encephalitis virus eradication program. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 161(2): 93-104.
- 26 Feitosa A.L.V.L., Teixeira M.F.S., Pinheiro R.R., Cunha R.M.S., Lima J.P.M.S., Andrioli A., Dantas T.V.M., Melo V.S.P. & Pinheiro D.S.S.N. 2010. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from Northern Brazil. *Small Ruminant Research*. 94(1-3): 205-209.
- 27 Flores E.F. 2007. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 888p.
- 28 Galiza Y.S., Eloy A.M.X., Pinheiro R.R., Peixoto R.M., Lima A.M.C., Barroso M.L.S. & Fonseca L.M. 2020. Study of metalloproteinases in the blood of goats experimentally infected with caprine encephalitis arthritis virus. *Semina: Ciências Agrárias*. 41(6): 3165-3176.
- 29 Gregory L., Lara M.C.C.S.H., Hasegawa R.S., Castro R.S., Rodrigues J.N.M., Araújo J., Keller L.W., Silva L.K.F. & Durigon E.L. 2011. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina no sêmen através das técnicas de PCR e Nested-PCR. *Arquivos do Instituto Biológico*. 78(4): 599-603.
- 30 Hasegawa M.Y., Lara M.C.C.S.H., Lobos E.M.C.V., Gaeta N.C., Hayashi M., Shirayama L., Castro R.S. & Gregory L. 2017. An experimental study on the vertical transmission of caprine arthritis-encephalitis virus from naturally infected females to their offspring. *Small Ruminant Research*. 149: 23-27.
- 31 Kurien B.T. & Scoweld H.R. 2006. Western Blotting. *Methods*. 38: 283-293.
- 32 Kurien B.T. & Scoweld H.R. 2015. Western Blotting: An Introduction. *Methods Molecular Biology*. 1312(3): 17-30.

- 33 Jensen E.C. 2012. The Basics of Western Blotting. *Anatomical Record*. 295(3): 369-371.
- 34 Larruskain A. & Jugo B.M. 2013. Retroviral infections in sheep and goats: small ruminant lentiviruses and host interaction. *Viruses*. 5(8): 2043-2061.
- 35 Lima C.C.V., Costa J.N., Souza T.S., Martinez P.M., Costa Neto A.O., Azevedo D.A.A., Pinheiro R.R. & Brito R.L.L. 2013. Immunodiagnostic for arthritis encephalitis caprine in flocks of semi-arid region in Bahia state, Brazil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 35(4): 358-364.
- 36 Lima C.C.V., Ayres M.C.C., Pinheiro R.R., Costa J.N., Andrioli A., Souza T.S., Azevedo D.A.A., Santos V.W.S., Araújo J.F., Sousa A.L.M., Peixoto R.M., Damasceno E.M. & Costa Neto A.O. 2017. Caprine lentivirus in sheep milk and semen. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 69(2): 391-397.
- 37 Lima C.C.V., Ayres M.C.C., Pinheiro R.R., Costa J.N., Souza T.S., Pinheiro A.A., Azevedo D.A.A. & Santos V.W.S. 2018. Transmission of caprine arthritis encephalitis virus between sheep. *Ciência Rural*. 48(10): e20180053.
- 38 López G.A., Rodríguez H.A.M. & Pérez J.T. 2012. Detección de anticuerpos contra lentivirus de pequeños rumiantes em fetos ovinos y caprinos. *Veterinaria México*. 43(1): 1-8.
- 39 Madruga C.R., Araújo F.R. & Soares C.O. 2001. *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 360p.
- 40 Manel N., Battini J.L., Taylor N. & Sitbon M. 2005. HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene*. 24: 6016-6025.
- 41 McConnell I., Peterhans E. & Zanoni R.G. 1998. Concordance with reference sera of a recombinant protein Elisa for maedi-visna antibody detection. *The Veterinary Record*. 142(16): 431-433.
- 42 Migliore S., Esposito E., Pirisinu L., Marcon S., Di Bari M., D'Agostino C., Chiappini B., Conte M., Sezzi E., De Grossi L., Agrimi U., Vaccari G. & Nonno R. 2012. Effect of PrP genotype and route of inoculation on the ability of discriminatory Western blot to distinguish scrapie from sheep bovine spongiform encephalopathy. *The Journal of General Virology*. 93(2): 450-455.
- 43 Miguel M.P., Menezes L.B. & Araujo E.G. 2012. *Western Blotting: A técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária*. *Enciclopédia Biosfera*. 8(15): 1704.
- 44 Minguijón E., Reina R., Pérez M., Polledo L., Villoria M., Ramírez H., Leginagoikoa I., Badiola J.J., García-Marín J.F., Andrés D., Luján L., Amorema B. & Juste R.A. 2015. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Veterinary Microbiology*. 181(1-2): 75-89.
- 45 Nascimento C.B., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Brito R.L.L., Rodrigues A.S., Silva R.A.B., Paula N.R.O. & Batista M.C.S. 2014. Ferramentas diagnósticas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes: padronização da técnica de ELISA indireto. *Arquivos do Instituto Biológico*. 81(1): 9-15.
- 46 Panneum S. & Rukkwamsuk T. 2017. Diagnosis of Caprine Arthritis Encephalitis Virus infection in dairy goats by ELISA, PCR and Viral Culture. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 20(2): 347-353.
- 47 Paula N.R.O., Andrioli A., Cardoso J.F.S.C., Santos D.O. & Eloy A.M.X. 2008. *Reprodução no Macho Caprino: Análise Básica e Aplicada*. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 30p.
- 48 Paula N.R.O., Andrioli A., Cardoso J.F.S., Pinheiro R.R., Sousa F.M.L., Souza K.C., Alves F.S.F., Campello C.C., Ricarte A.R.F. & Teixeira M.F.S. 2009. Profile of the Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in blood, semen from bucks naturally and experimentally infected in the semi-arid region of Brazil. *Small Ruminant Research*. 85(1): 27-33.
- 49 Peixoto R.M. 2014. Avaliação comportamental, fisiológica e hematológica de reprodutores caprinos portadores do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e análise do teste de *Western Blotting* no plasma seminal. 52f. Sobral, CE. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú.
- 50 Peixoto R.M., Andrioli A., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Santos V.W.S., Sousa M.M., Azevedo D.A.A., Damasceno E.M. & Teixeira M.F. 2018. *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos leiteiros no estado do Ceará em associação com o vírus da artrite encefalite caprina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46: e1533.
- 51 Pinheiro R.R., Andrioli A., Gouveia A.M.G., Aragão M.A.C. & Martinez P.M. 2010. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arquivos do Instituto Biológico*. 77: 133-137.
- 52 Pinheiro R.R., Andrioli A., Sider L.H., Santiago L.B., Oliveira E.L., Sousa A.L.M., Alves F.S.F. & Cruz J.C.M. 2012. *Lentivirose em pequenos ruminantes: principais métodos de diagnóstico*. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, p.1-32.

- 53 Pisoni G., Bertoni G., Manarolla G., Vogt H.F., Scaccabarozzi L., Locatelli C. & Moroni P. 2010. Genetic analysis of small ruminant lentiviruses following lactogenic transmission. *Virology*. 407(1): 91-99.
- 54 Preziuso S., Sanna E., Sanna M.P., Loddo C., Cerri D., Taccini E., Mariotti F., Braca G., Rossi G. & Renzoni G. 2003. Association of maedi visna virus with *Brucella ovis* infection in rams. *European Journal of Histochemistry*. 47(2): 151-158.
- 55 Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. 2005. Retroviridae. Grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, pp.346-357.
- 56 Rachid A., Croisé B., Russo P., Vignoni M., Lacerenza D., Rosati S., Kuzmak J. & Valas S. 2013. Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. *The Journal of General Virology*. 94(3): 634-642.
- 57 Radostits O.M., Blood D.C., Hinchcliff K.W. & Gay C.C. 2002. *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.1098-1101.
- 58 Ramírez, H., Román B.S., Glaria I., Reina R., Hernández M.M., Andrés X., Crespo H., Hichou B., Cianca S., Goni C., Grandas A., García-Pastor L., Vijil L.E., Quintín F., Grilló M.J., Andrés D. & Amorema B. 2009. Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology*. 72(8): 1085-1096.
- 59 Ramírez H., Reina, R., Bertolotti L., Cenoz A., Hernández M.M., Román B.S., Glaria I., Andrés X., Crespo H., Jáuregui P., Benavides J., Polledo L., Pérez V., García-Marín, Rosati S., Amorema B. & Andrés D. 2012. Study of compartmentalization in the visna clinical form of small ruminant lentivirus infection in sheep. *BMC Veterinary Research*. 8(8): 1-12.
- 60 Ravazzolo A.P., Nenci C., Vogt H.R., Waldvogel A., Obexer-Ruff G., Peterhans E. & Bertoni G. 2006. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*. 350(1): 116-127.
- 61 Rodrigues A.S., Brito R.L.L., Pinheiro R.R., Dias R.P., Alves S.M., Souza T.S., Souza K.S., Azevedo D.A.A., Andrioli A., Magalhães D.C.T. & Teixeira M.F.S. 2014. Padronização do Elisa indireto e *Western Blot* para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2): 417-424.
- 62 Rodrigues A.S., Pinheiro R.R., Brito R.L.L., Oliveira L.S., Oliveira E.L., Santos V.W.S., Andrioli A., Souza T.S., Dias R.P. & Teixeira M.F.S. 2017. Evaluation of caprine arthritis- 48 encephalitis virus transmission in newborn goat kids. *Arquivos do Instituto Biológico*. 84(1): e0542016.
- 63 Rodrigues A.S., Pinheiro R.R., Brito R.L.L., Andrioli A., Oliveira E.L., Sider L.H., Santos V.W.S., Oliveira L.S., Dias R.P., Gouveia A.M.G. & Teixeira M.F.S. 2018. Avaliação de um controle estratégico da artrite encefalite caprina em rebanho caprino leiteiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 70(1): 139-146.
- 64 Rodrigues A.S., Pinheiro R.R., Brito R.L.L., Oliveira L.S., Oliveira E.L., Santos V.W.S., Andrioli A., Souza T.S., Dias R.P. & Teixeira M.F.S. 2018. Evaluation of caprine arthritis-encephalitis virus transmission in newborn goat kids. *Arquivos do Instituto Biológico*. 84(1-5): e0542016.
- 65 Rodríguez H.A.M., Álvarez H.R., Pérez J.T., Setién A.A., Fariña G.I.G. & Crespo J.A.M. 2005. Effect of the caprine arthritis encephalitis virus in the reproductive system of male goats. *Veterinária México*. 36(2): 159-176.
- 66 Rosa M.C., Silva N.M.O. & Hora V.P. 2016. Patogênese do HIV – características do vírus e transmissão materno-infantil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. 48(4): 301-306.
- 67 Santos K.F., Eloy A.M.X., Matos M.N.C., Peixoto R.M., Aragão P.T.T.D., Pinheiro R.R. & Cunha R.M.S. 2019. Use of proteomics in the study of the acute phase of caprine arthritis encephalitis in seminal plasma. *Small Ruminant Research*. 181: 39-44.
- 68 Santos V.W.S. 2014. Estudo zoonosológico e fatores de risco associados à Artrite-encefalite caprina nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Sergipe. 61f. Sobral, CE. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú.
- 69 Seitz R. 2016. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 43: 203-222.
- 70 Silva A.V.M., Paula A.A., Pereira D.P., Brasil R.P. & Carreira J.C.A. 2009. Canine Leishmaniasis in Brazil: serological follow-up of a dog population in an endemic area of American Visceral Leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*. 2009: 680790.
- 71 Sousa A.L.M., Pinheiro R.R., Araújo J.F., Santos V.W.S., Azevedo D.A.A., Peixoto R.M., Souza V., Andrioli A., Damasceno E.M., Dantas T.V.M. & Teixeira M.F.S. 2018. *In vitro* and *in vivo* evaluation of sodium dodecyl sulfate (SDS) as an inactivator of caprine lentivirus (CLV) in colostrum and milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 70(5): 1459-1467.

- 72 Sousa M.M., Andrioli A., Pinheiro R.R., Alves F.S.F., Santos V.W.S., Damasceno E.M., Araújo J.F., Sousa A.L.M. & Vieira L.S. 2019. An epidemiological study of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in breeder goats from Northeastern Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 40(5): 1957-1866.
- 73 Souza K.C., Pinheiro R.R., Santos D.O., Brito R.L.L., Rodrigues A.S., Sider L.H., Paula N.R.O., Ávila A.A., Cardoso J.F.S. & Andrioli A. 2013. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. *Small Ruminant Research*. 109(2-3): 193-198.
- 74 Souza K.C., Andrioli A. & Teixeira M.F.S. 2015. Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 38(2): 92-97.
- 75 Souza K.C., Andrioli A., Sider L.H., Pinheiro R.R., Bezerra Junior R.Q., Peixoto R.M. & Teixeira M.F.S. 2015. Detecção de sequências do DNA proviral do vírus da artrite encefalite caprina em saliva. *Acta Scientiae Veterinariae*. 43: e1266.
- 76 Souza T.S., Pinheiro R.R. & Lima C.C.V. 2012. Transmissão Interspecie dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes: Revisão e Desafios. *Acta Veterinaria Brasilica*. 6(1): 23-34.
- 77 Souza T.S., Costa J.N., Pinheiro R.R., Lima C.C.V., Melo F.C.C., Andrioli A., Azevedo D.A.A., Santos V.W.S., Oliveira E.L. & Costa Neto A.O. 2014. Duração da imunidade passiva para lentivírus de pequenos ruminantes em cordeiros. *Semina: Ciências Agrárias*. 35(2): 845-856.
- 78 Souza T.S., Pinheiro R.R., Costa J.N., Lima C.C.V., Andrioli A., Azevedo D.A.A., Santos V.W.S., Araújo J.F., Sousa A.L.M., Pinheiro D.N.S., Fernandes F.M.C. & Costa Neto A.O. 2015. Interspecific transmission of small ruminant lentiviruses from goats to sheep. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(3): 867-874.
- 79 Souza T.S., Pinheiro R.R., Lima C.C.V., Brito R.L.L., Azevedo D.A.A., Dias R.P., Santos V.W.S., Andrioli A. & Costa J.N. 2018. Sheep infection by caprine lentivirus. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 19(3): 268-276.
- 80 Thomann B., Falzon L.C., Bertoni G., Vogt H.R., Schupbach-Regula G. & Magouras I. 2017. Census to determine the prevalence and risk factors for caprine arthritis-encephalitis virus and visna maedi virus in the Swiss goat population. *Preventive Veterinary Medicine*. 137: 52-58.
- 81 Tu P.A., Shiu J.S., Lee S.H., Pang V.F., Wang D.C. & Wang P.H. 2017. Development of a recombinase polymerase amplification lateral flow dipstick (RPA-LFD) for the field diagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) infection. *Journal of Virological Methods*. 243: 98-104.
- 82 Van der Kuyl A.C. 2012. HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology*. 9(6): 1-10.
- 83 Varea R., Monléon E., Pacheco C., Luján L., Bolea R., Vargas M.A., Van Eynde G., Saman E., Dickson L., Harkiss G., Amorema B. & Badiola J.J. 2001. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13: 301-307.