

Métodos de Diagnóstico das Lentiviroses de Pequenos Ruminantes

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) o vírus Maedi-Visna (MVV) e o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) pertencem a família *Retroviridae*, sendo que o CAEV infecta caprinos de diferentes raças, idades e sexo, com quadros clínicos de leucoencefalomielite em cabritos e artrite crônica, mamite e pneumonia em adultos. O MVV causa alterações nos pulmões, sistema nervoso central, glândula mamária e articulações, principalmente em adultos. Na artrite encefalite caprina (CAE), as perdas econômicas se caracterizam por morte de animais jovens, diminuição da produção de leite e do período de lactação, perda de peso, redução do peso ao nascer e da taxa de crescimento. Além disto, os reprodutores com graves problemas articulares tornam-se incapazes de realizar a monta ou mesmo de responderem a coleta de sêmen por vagina artificial. Se por um lado à manutenção de animais infectados no rebanho representa sérias perdas econômicas, o sacrifício de todos os animais infectados é, muitas vezes, inviável, como no caso de grande parte do rebanho estar acometida. Mas, sobretudo, pela grande perda do material genético. Desta forma, têm sido implantados programas de controle, visando a obtenção de crias de animais enfermos antes de descartá-los. Além destes prejuízos, a presença de animais enfermos por LVPR reduz o comércio e o trânsito de pequenos ruminantes entre países livres e países onde a infecção é endêmica.

O diagnóstico dos LVPR fundamenta-se no quadro clínico (quando presente), consolidado por provas laboratoriais para detecção direta do vírus ou do seu material genético ou, ainda, através da detecção de anticorpos. O isolamento viral, a microscopia eletrônica, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização *in situ* são os principais métodos utilizados para a detecção direta do CAEV. Em decorrência das características da própria enfermidade, principalmente quanto ao seu caráter de infecção persistente, a sorologia para detecção do LVPR é uma forma funcional de diagnóstico, podendo ser realizada através de técnicas

como: imunodifusão em gel de ágar, imunofluorescência indireta, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), *Dot-Blot* e *immunoblotting*.

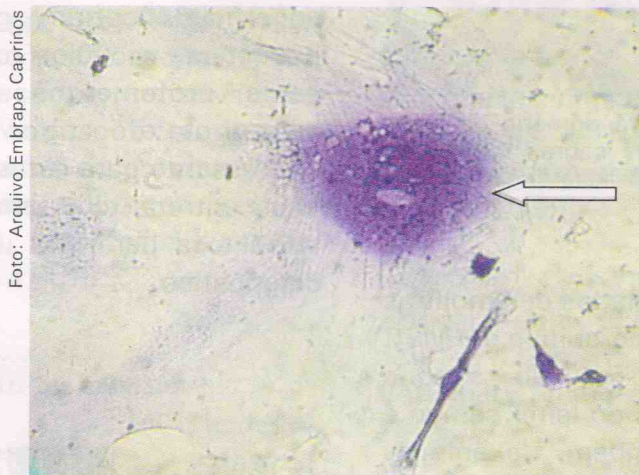


Foto: Arquivo Embrapa Caprinos

Fig. 1. Sincício (seta) em cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV. Coloração cristal violeta 0,1%, aumento 320X.

Circular 25
Técnica

Sobral, CE
Dezembro, 2001

Autores

Raymundo Rizado Pinheiro
Méd. Vet., D.Sc., em Ciência Animal
Pesquisador da Embrapa Caprinos
E-mail: rizado@cnpq.embrapa.br

Alice Andrioli Pinheiro
Méd. Vet., D.Sc., em Ciência Animal
Pesquisadora da Embrapa Caprinos
E-mail: alicep@embrapa.br

Aurora Maria Guimarães Gouveia
Méd. Vet., D.Sc., Epidemiologia/Virologia
Pesquisadora da Embrapa Caprinos
E-mail: aurora@vet.ufmg.br

Métodos de Diagnóstico Direto

Isolamento viral

O isolamento viral em cultivo de células tem sido um dos métodos laboratoriais de diagnóstico mais utilizados em virologia, sendo considerado um teste padrão. O isolamento tem também a vantagem de discriminar entre microrganismos vivos e mortos. No entanto, a técnica, apesar de sensível, apresenta algumas restrições, pois é trabalhosa, onerosa e lenta, necessitando de implantação de cultivos celulares especiais, além de não detectar os vírus que não causam efeito citopático (ECP) em cultivos celulares.

Para o isolamento do lentivírus caprino de amostras clínicas, utiliza-se cultivo primário de células de membrana sinovial de caprinos (MSC), sendo que o ECP característico é a presença de células multinucleadas típicas (sincício) (Figuras 1 e 2).

Foto: Arquivo Embrapa Caprinos



Fig. 2. Sincício (seta) de cultura primária de MSC inoculada com fluido uterino de cabras infectadas naturalmente com o CAEV. Coloração cristal violeta 0,1%, aumento 200x.

Os LVPR podem ser isolados de amostras de animais vivos, tanto pelo co-cultivo em MSC de células, como leucócitos do sangue periférico, células somáticas do leite, sêmen e fluidos uterinos, como, também, de animais mortos infectados, a partir de *explants* de tecidos como membrana sinovial (MSC), glândula mamária, pulmão, plexo coróide e tecidos linfóides.

No caso de detecção viral em amostras de sêmen, pode haver substâncias antivirais ou tóxicas para as células MSC presentes no plasma seminal. O sêmen pode, também, apresentar forte carga de contaminação bacteriana, sendo necessários o tratamento prévio com antibióticos e a diluição, com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos das substâncias presentes no plasma seminal. Todavia, a diluição do sêmen pode diminuir a carga viral a valores abaixo do detectável em cultura, levando a resultados falso-negativos.

Como uma das características principais dos lentivírus é apresentar replicação lenta, eles necessitam de, no mínimo, três passagens de células, com 7 dias de intervalos, para que o ECP comece a ser observado. Uma grande variação é verificada quanto ao tipo e ao tempo de aparecimento do ECP produzido pelos isolados, além disso, os isolados virais de LVPR podem não causar efeitos citopáticos evidentes.

Microscopia Eletrônica (ME)

As partículas virais do CAEV medem de 70 a 110 nm, com um corpo central de 30 a 50 nm, apresentam forma e tamanho semelhantes aos do MVV. Nas células infectadas com LVPR observam, por ME, vários brotamentos virais com 120 a 140 nm de diâmetro além de virions livres no espaço extracelular, medindo de 80 a 110 nm de diâmetro, e, virions e fragmentos virais no citoplasma de células infectadas (Figura 3). Os brotamentos virais na sua superfície ocorrem geralmente dentro de pequenos vacúolos citoplasmáticos, sendo estes brotamentos similares àqueles de retrovírus do tipo C. Este método é interessante para estudo de ultraestrutura dos vírus entretanto é uma técnica muito cara e trabalhosa para sua utilização em rotina de diagnóstico.



Foto: Arquivo Embrapa Caprinos

Fig. 3. Microscopia eletrônica vários brotamentos virais com 120 a 140 nm de diâmetro.

Hibridização *in situ* (HIS)

Esta técnica consiste na identificação de segmentos específicos de ácido nucléico de origem viral, encontrados em tecidos ou células infectados, capazes de serem detectados por sondas marcadas por enzimas ou por radioatividade. Esta técnica é de uso limitado, em decorrência da alta mutabilidade dos LVPR, além de ser laboriosa e cara para ser colocada em rotina, entretanto pode ser utilizada para dirimir dúvidas de resultados duvidosos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação *in vitro* dos ácidos nucléicos permite a obtenção de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA. Desta forma, a PCR vem sendo adotada em todo o mundo na pesquisa de microrganismos devido à especificidade, sensibilidade e rapidez de seus resultados. É possível detectar o DNA proviral do CAEV um dia após a infecção dos cultivos celulares, e de apenas uma célula infectada em um cultivo de 10^6 células, sendo que PCR é a técnica mais eficiente em detectar DNA no sangue nos estágios iniciais da doença.

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR no diagnóstico veterinário apareceram no final dos anos 80, e tem sido de grande importância para o diagnóstico de doenças virais, em várias amostras de animais, visto que os métodos de diagnóstico tradicionais requerem longos e complexos procedimentos, como cultivo de células e microscopia eletrônica. Outra vantagem da PCR é que esta

técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA e RNA viral presentes no material, amplificando-o em quantidades identificáveis. Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo ou que se encontrem sob estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro, ou, ainda, microrganismos mortos, podem ser detectados pelo método.

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras como: sangue, líquido sinovial, leite e soro de leite, tecidos, sêmen, fluidos uterinos e embrião (Figura 4).

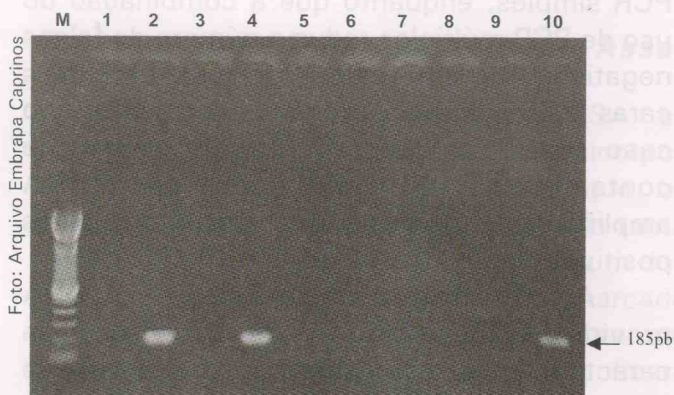


Foto: Arquivo Embrapa Caprinos

Fig. 4. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Reação em cadeia da polimerase PCR *Nested* de amostras de fluido uterino de cabras infectadas com o CAEV, bandas de 185pb. Sendo M marcador DNA Ladder; 2 e 4 - amostras positivas; 1, 3, 5, 6, 7 e 8 amostras negativas; 9 controle negativo e 10 - controle positivo.

Quanto à detecção dos lentivírus no sêmen, tem sido descrita a presença de fatores inibidores da síntese de ácidos nucléicos presentes no plasma seminal. Esses fatores interferem no uso do DNA como *template*, pois parece que esses oligopeptídeos se ligam ao DNA. Desta forma, são utilizadas algumas técnicas para separar o plasma seminal das células.

No caso dos LVPR, esta técnica é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou de resultado sorológico duvidoso. Porém, parecem não haver relação entre o título de anticorpos e o aparecimento de bandas positivas à PCR no sangue e nem todas as amostras positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR.

Cerca de 3000 monócitos, contendo de 30 a 240 células infectadas, são suficientes para gerar resultados positivos na PCR, porém há uma quantitativa diferença no nível de células associadas ao vírus entre animais, os quais podem variar de 10^3 a 10^5 monócitos para a detecção. Desta forma, parece que a taxa de infecção dos monócitos varia entre indivíduos portadores da CAE, provavelmente, devido ao nível de restrição da expressão viral, portanto, a sensibilidade depende do tamanho da amostra.

A PCR *Nested* ou PCR duplo *Nested* aumenta a sensibilidade quando comparada à PCR simples, enquanto que a combinação do uso de PCR múltiplos reduz o número de falsos negativos. Porém, estas técnicas são mais caras e trabalhosas, além de apresentar, no caso da PCR *Nested* grande risco de contaminação do laboratório com DNA amplificado levando a ocorrência de falsos positivos.

A dificuldade em amplificar o DNA proviral dos lentivírus pode estar na sua característica em apresentar uma alta taxa de mutação. A região *gag* do genoma dos lentivírus é a mais conservada, quando comparada às regiões *pol* e *tat*. A variação das seqüências de bases no genoma dos lentivírus afetam a eficiência da PCR, pois esta é intimamente dependente da complementaridade entre os *primers* e *template*. Os vírus RNA de forma geral e particularmente os lentivírus apresentam grande variedade de *quasispécies*, o que se atribui ao fato da RNA polimerase ter, intrinsecamente, altas taxas de erro, desta forma, os lentivírus se reproduzem imperfeitamente. Este mecanismo é útil aos vírus na sua habilidade de escape das defesas do hospedeiro e de produzir infecção persistente. Desta forma, a escolha dos *primers* é de suma importância para o sucesso da técnica de PCR.

Esta técnica poderá ser utilizada em programas de erradicação, quando estiver disponível rotineiramente, para identificar os animais não diagnosticados por sorologia. Devido ao alto custo e aos resultados discordantes entre testes sorológicos e PCR, sugere-se que esta técnica seja empregada

para esclarecer resultados sorológicos indeterminados ou negativos.

Métodos de Diagnóstico Indireto

Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)

Devido à praticidade na coleta das amostras e ao baixo custo/benefício, a detecção de anticorpos, contra LVPR, é amplamente utilizada, sendo a IDGA recomendada para o diagnóstico inicial de triagem num rebanho ou região onde seja desconhecida a prevalência da CAE. Este teste é recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para o diagnóstico de infecção por LVPR, no caso de comércio internacional de pequenos ruminantes (OIE, 1996). O teste de imunodifusão dupla de Ouchterlony fundamenta-se na difusão de anticorpo e antígeno em uma base semi-sólida contendo ágar e eletrólitos. Quando antígeno e anticorpo se encontram em concentrações equivalentes, interatuam e precipitam, formando imunocomplexos estáveis que podem ser visualizados como linhas de precipitação.

O teste de microimunodifusão (MIDGA) para o diagnóstico dos lentivírus, reduz o custo por diminuir comparativamente a quantidade de antígeno necessário no teste. O MIDGA mais utilizado é o hexagonal por apresentar melhores resultados, dado que a amostra de soro a ser testada fica posicionada entre dois padrões positivos, facilitando a leitura do resultado.

As proteínas gp 135 e p28 dos LVPR (Figura 5 e 6) são as responsáveis pelas linhas de precipitação observadas no teste de IDGA, sendo que o antígeno gp 135 detecta maior número de caprinos infectados do que o antígeno p28, ainda que alguns animais desenvolvam resposta anti-p28 na ausência de resposta anti-gp 135. Salienta-se, portanto, a importância da escolha dos soros de referência utilizados em testes IDGA para diagnóstico de infecção por LVPR. Além disto, a sensibilidade do antígeno produzido a partir do vírus da CAE é, aproximadamente, 35% maior do que a obtida no teste que emprega o antígeno heterólogo (MVV).

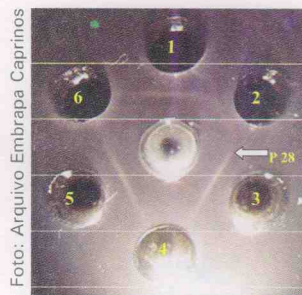


Fig. 5. MIDGA realizado com antígeno de CAEV com a proteína p28. Os poços 1, 3 e 5 possuem soro reagente. O poço 2 soro positivo, o poço 4 soro negativo e o poço 6 soro fraco positivo.



Fig. 6. MIDGA realizado com antígeno de CAEV com as proteínas p28 e gp 135. Os poços 1, 3 e 5 possuem soro reagente para as duas proteínas. Os poços 2 e 6 soro negativo para p28 e positivo para gp 135. O poço 4 soro positivo para as duas proteínas.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As reações de imunofluorescência indireta possibilitam a visualização da interação antígeno/anticorpo, através de uma anti-imunoglobulina com fluorocromos. Estas substâncias são capazes de absorverem energia luminosa tornando-se excitadas por um curto espaço de tempo. Tais substâncias passam a liberar tal energia na forma de fluorescência (Figura 7). Os fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina (fluorescência vermelha) e o isotiocianato de fluoresceína (fluorescência verde).

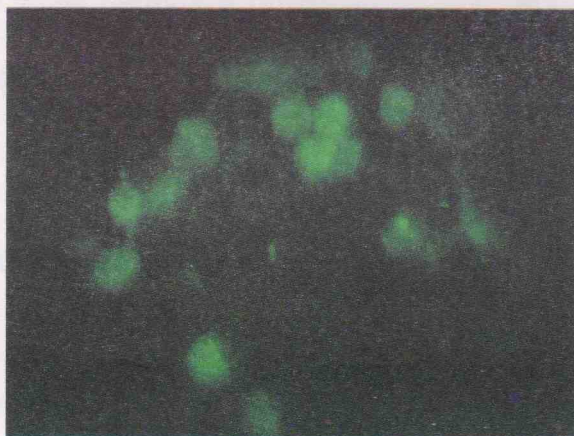


Fig. 7. Imunofluorescência indireta de soro positivo para LVPR (400x).

Esta técnica pode ser usada para detectar e titular anticorpos, como também, identificar e localizar antígenos.

São poucos os trabalhos, na literatura, empregando RIFI no diagnóstico dos LVPR.

Comparando os testes RIFI, IDGA e ELISA, na pesquisa de anticorpos contra o MVV, verificaram que o a RIFI e a IDGA apresentaram concordância de 94%. Utilizada como referência em outras retrovirose, tais como a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), a RIFI chega a 100% de concordância entre o ELISA e *Immunoblotting*.

Apesar da técnica apresentar uma boa sensibilidade e ser relativamente barata, é necessário um treinamento específico, principalmente com relação à leitura dos resultados.

Ensaio Imunoenzimáticos

Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) se baseia na utilização de antígenos ou anticorpos marcados com enzima, de forma que os conjugados resultantes tenham atividade tanto imunológica como enzimática. Estando um dos componentes (antígeno ou anticorpo) marcado com uma enzima e insolubilizado sobre um suporte, a reação antígeno-anticorpo ficará imobilizada e poderá, facilmente, ser revelada mediante a adição de um substrato específico que, sob ação da enzima, produzirá uma cor vista a olho nu e quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro (Figura 8).

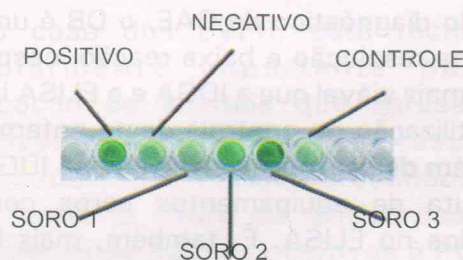
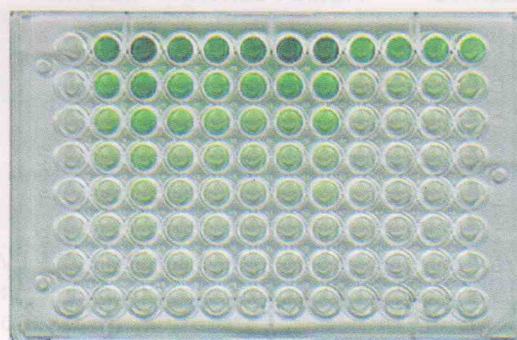


Fig. 8. Placa de ELISA com resultados positivos e negativos para LVPR.

Diversos testes de ELISA foram desenvolvidos para a detecção de anticorpos para LVPR, onde são empregados tanto antígenos nativos como recombinantes. De acordo com o antígeno e a técnica do ELISA empregados (indireto, sanduíche, etc) existe uma grande variação de sensibilidade e especificidade. Apesar disto, esta técnica, de uma maneira geral, apresenta boa sensibilidade e mantém alta a especificidade. Sendo, portanto, indicada na utilização de programa de controle desta enfermidade. É aconselhável a utilização de antígeno com pelo menos duas ou mais proteínas, de preferência a *core* proteína p28, a transmembrânica gp40 e a de superfície gp135, ou com o vírus total.

Dot-Blot (Dot-ELISA ou Dot-immunoblotting)

O *Dot-immunoblotting* pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras; ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. As amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose coberta com anticorpos e analisadas por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada como um método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do immunoblotting após a transferência do antígeno para a membrana.



Fig. 9. *Dot-Blot* para o diagnóstico sorológico de LVC de um *pool* de soros positivos, fracos positivos e negativos, testados pelo IDGA.

No diagnóstico da CAE, o DB é um teste com boa resolução e baixa reação inespecífica sendo mais viável que a IDGA e o ELISA indireto para utilização no controle desta enfermidade, pois além de ser mais sensível que a IDGA, não necessita de equipamentos caros como os utilizados no ELISA. É, também, mais barato, mais rápido e, conseqüentemente, mais prático, podendo ser utilizado em eventos (exposições, leilões, etc) ou, até mesmo, no campo.

Immunoblotting ou Western blotting

Em decorrência de ser uma técnica demorada e laboriosa vem sendo utilizada em LVPR somente para esclarecer resultados divergentes e no estudo da composição das proteínas virais dos LVPR. Na sua execução, o material protéico viral é separado por eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Na membrana, o complexo antígeno/anticorpo é visualizado através da aplicação de um conjugado enzimático ao qual se adiciona um substrato que reage com a enzima, dando cor à reação. O *immunoblotting* detecta anticorpos para p28 já aos 4 dias pós-infecção, enquanto no ELISA indireto os anticorpos são detectados 15 a 20 dias pós-infecção. Comprova-se, assim, a alta sensibilidade do *immunoblotting* para detecção precoce de anticorpos para o CAEV. Apesar de ser considerado como *gold test* não se conhece a sensibilidade relativa do *immunoblotting* para detecção de anticorpos para LVPR (Figura 10).

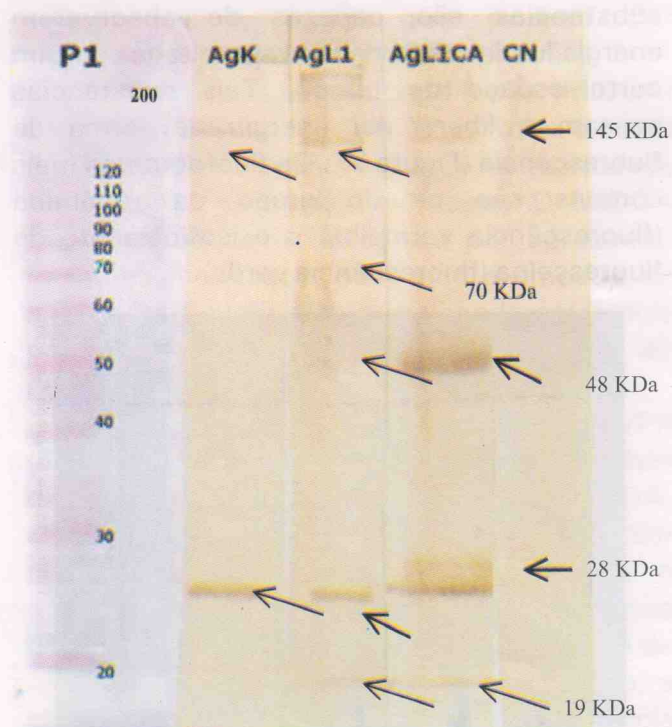


Fig. 10. *Immunoblotting* de soro positivo para LVPR testado em vários antígenos (Ag): Ag comercial (AgK), antígeno nacional concentrado (AgL) e antígeno nacional purificado por afinidade em coluna anti-LVPR (AgL,CA) e confrontado com padrão de peso molecular (P1) e controle negativo (produzido a partir de células de membrana sinovial de caprino não infectada CN).

Conclusão

A detecção precoce e a remoção dos animais infectados dos rebanhos são à base do sucesso dos programas de controle. Portanto, a eficiência de programas de controle das LVPR depende da sensibilidade e da especificidade do teste diagnóstico, da frequência de sua utilização num determinado rebanho e do manejo utilizado neste mesmo rebanho. A identificação dos animais infectados por LVPR é geralmente feita de forma indireta, sendo a Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) com antígenos de origem ovina e caprina, o teste comumente empregado. A IDGA é o teste recomendado pela Organização Internacional de Epizootias para diagnóstico dos LVPR, o qual além de prático tem baixo custo e boa especificidade. Entretanto, os animais infectados por estes vírus podem apresentar soroconversão tardia e variação nos níveis de anticorpos durante a vida, o que reduz a sensibilidade, e tem implicação direta no sucesso de programas de controle destas enfermidades. Somado a isto, a grande variabilidade antigênica e genética dos LVPR induz à necessidade do desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico dos LVPR, para que possa reduzir o número de resultados falsos-negativos.

Como teste inicial de triagem para detecção de animais portadores de LVPR, o teste de IDGA pode ser utilizado, entretanto deve ser feito de preferência com antígeno homólogo e que possua, preferencialmente, duas proteínas (p28 e gp 135). Além deste teste, pode ser utilizado o teste *Dot-Blot*, que é mais prático e apresenta sensibilidade semelhante ao ELISA. No caso de programas de controle mais avançados ou programas de erradicação devem ser utilizadas provas sensíveis como o ELISA, associadas a provas de detecção direta como a PCR.

Bibliografia Consultada

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 68p. Tese Doutorado.

BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H.H. **Handbook of immunoblotting of proteins: technical descriptions.** Florida: CRC Press, 1988. 265p v.1.

BRODIE, S.; PEARSON, L.; ZINK, M.; BICKLE, H.; ANDERSON, B.; MARCOM, K.; DEMARTINI, J. Ovine lentivirus expression and disease. virus replication, but not entry, is restricted to macrophages of specific tissues. **American Journal Pathology**, v.146, p. 250-263, 1995.

CASTRO, R.S. **Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 132p. Tese Doutorado.

DAWSON, M. Caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna: complex disease syndromes associated with lentivirus infections of goats and sheep. **Goat Veterinary Society Journal**, v. 4, n. 2, p. 25-28, 1983.

GOUVEIA, A.M.G. **Padronização de microtécnica de imunodifusão em gel de agarose para diagnóstico de lentivírus Pneumonia Progressiva Ovina (OPP) - Maedi-Visna (MVV) - Artrite Encefalite Caprina (CAEV).** Sobral, 1994. 4p. (Mimeografado).

GOUVEIA, A.M.G. **Relatório de Consultoria: Setor de Sanidade Animal.** Sobral: EMBRAPA-CNPC, 1994. 127p.

GREENWOOD, P.L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in NewSouth Wales, Australia. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 22, v. 1/2, p. 71-87, 1995.

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

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

LEROUX, C.; CHASTANG, J.; GREENLAND, T.; MORNEX, J.F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1125-1137, 1997.

MARCHESIN, D.M. **Caracterização molecular de parte do gene gag dos lentivírus artrite-encefalite caprina (CAEV) e maedi-visna dos ovinos (MVV), isolados de animais naturalmente infectados do Rio Grande do Sul, Brasil.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. 111p. Dissertação Mestrado.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. World Organization for Animal Health, 1996. 398p.

OLIVER, R.E.; GORHAM, J.R.; PARISH, S.F.; HADLOW, W.J.; NARAYAN, O. Ovine progressive pneumonia: pathologic and virologic studies on the naturally occurring disease. **American Journal of Veterinary of Research**, v. 42, n. 9, p. 1554-1559, 1981.

PASICK, J. Maedi-Visna vírus and Caprine Arthritis-Encephalitis vírus: distinct species ou *quasispecies* and its implications for laboratory diagnosis. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.

PINHEIRO, R.R. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina: desenvolvimento e padronização de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e Dot-Blot) e estudo epidemiológico no Estado do Ceará.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. 115p. Tese Doutorado.

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

RIBEIRO, L.A.O. **Risco de introdução de doenças exóticas pela importação de ovinos.** **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico UFPEL**, v.13, p. 39-44, 1993.

ROSATI, S.; PITTAU, M.; TOLARI, F.; ERRE, G.; KWANG, J. Genetic and antigenic characterization of CAEV (caprine arthritis-encephalitis virus) recombinant transmembrane protein. **Veterinary of Microbiology**, v. 45, v. 4, p. 363-370, 1995.

ROWE, J.D.; EAST, N.E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice**, v. 13, n 1, p. 35-53, 1997.

SCHADE, K.H. **Light microscopy: technology and application.** 2.ed. Munchen: Verlag Moderne Industrie, 1995. 70 p.

STOTT, D.I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 153-187, 1989.

ZANONI, R.G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1951-1961, 1998.

Circular Técnica, 25



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Caprinos
 Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 Caixa Postal D 10, CEP 62011-970 Sobral, CE
 Fone: (0xx88) 677-7000
 Fax: (0xx88) 677-7055
 Home-page: <http://www.cnpc.embrapa.br>
 E-mail: sac@cnpc.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2001): 500 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: *Ângela Maria Xavier Eloy*
 Secretário-Executivo: *Francisco Selmo Fernandes Alves*
 Membros: *José Ubiraci Alves*
Luiz da Silva Vieira
Tânia Maria Chaves Campêlo

Expediente

Supervisor editorial: *Tânia Maria Chaves Campêlo*
 Tratamento das ilustrações: *Raymundo Rinaldo Pinheiro*
 Editoração eletrônica: *Fábio de Sousa Fernandes*