

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

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS MAEDI/VISNA ATRAVÉS DE  
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ANIMAL  
COMPROVADAMENTE SOROPOSITIVO PELO IDGA.**

**Fortaleza/Ceará  
Dezembro de 2003**

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

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS MAEDI/VISNA ATRAVÉS DE  
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE ANIMAL COMPROVADAMENTE  
SOROPOSITIVO PELO IDGA.

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

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Orientadora:** Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Fortaleza/Ceará  
Dezembro de 2003

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

**Título do Trabalho:** Isolamento e Identificação do Vírus Maedi/Visna Através de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Animal Comprovadamente Soropositivo pelo IDGA.

**Autor:** Ney de Carvalho Almeida

Aprovada em 17/12/2003

Banca examinadora:

---

Profª. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira  
Orientadora

---

Prof. Dr. José Albérico de Araújo Lima  
Co-orientador/Examinador

---

Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro  
Examinador

---

Profª. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes  
Examinadora

“... se não fosse por ele, com toda a probabilidade, aquela obra não teria sido projetada, nem quando projetada, escrita e nem quando escrita, impressa”.

Matemático *Augustus De Morgan*

A Deus, primeiramente e principalmente.  
Aos meus pais, familiares e a minha  
namorada Adriana.  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira pela amizade, apoio e colaboração em minha formação profissional e humana;

Ao Prof. Dr. José Albérico de Araújo Lima por oferecer-me a oportunidade de sua honrosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro pelos ensinamentos que me levou a reflexão de diversas dúvidas.

A Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes pelas idéias e opiniões no desenvolvimento deste trabalho e de minha formação futura.

Ao Prof. Dr. José Rafael Rosito Coiro por sua orientação desde a época de meu estágio supervisionado de conclusão de curso, e hoje por sua colaboração profissional, além da boa amizade e exemplo de pessoa humana que pude sentir e presenciar.

Aos meus grandes amigos do laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA): Ana Helena Brittes, Leandro Gianluppi, Maina Bonetti, Carlos Barboza pela eterna amizade.

Aos grandes amigos do Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará: Cesarino Junior Lima Aprígio, Francisco Jarbas Santos de Sousa, Jean Berg Alves da Silva, Lívia Maria Nogueira de Castro, Galileu Planck Amaral dos Santos, Susana Aparecida Araújo, Tânia Valeska Medeiros e a Ana Cristina Farias Ribeiro que me ajudaram direta e indiretamente na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade do meu curso de Mestrado.

À Universidade Luterana do Brasil pela realização da Microscopia Eletrônica

A todos os meus colegas de curso de Mestrado

A Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pela bolsa de mestrado concedida para que pudesse desenvolver minha pesquisa.

A todos os funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

E a todos os meus amigos que acreditaram em mim,

Os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A ovinocultura do Nordeste é uma das grandes responsáveis pela fixação do homem no campo, porém esta prática está sendo ameaçada por diversas enfermidades, incluindo Maedi/Visna. O desenvolvimento deste trabalho ocorreu após a comprovação sorológica da doença Maedi/Visna no rebanho ovino nordestino, onde para verificar a real existência do lentivírus Maedi/Visna (MVV), este deveria ser diagnosticado por outras técnicas virológicas. Daí utilizou-se um animal soropositivo pelo teste de Imunodifusão em Gel de Agarose, nativo da região Nordeste do Brasil, de onde se obteve o sangue que continha células infectadas e fez-se o cocultivo com células fibroblásticas susceptíveis a replicação viral. Os MVV obtidos a partir do cocultivo foram purificados e testados quanto a sua presença pelo teste de Microscopia eletrônica, quanto a visualização de monócitos infectados pela técnica de imunoperoxidase, pelo teste de ELISA onde testou-se o MVV nativo em comparação ao MVV padrão (cepa k1514) com IgG padrão, e pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) para determinar as principais bandas protéicas que continha o vírus em relação a proteína padrão viral gp 135. Desta forma, em todas as técnicas desenvolvidas foram encontrados os valores mais expressivos como resultados, isto é, partícula viral característica; monócito infectado e evidenciado pela peroxidase, ELISA do MVV nativo condizente com MVV padrão e banda protéica semelhante. Assim, o MVV realmente está presente no rebanho ovino do Nordeste.

## ABSTRACT

The sheep's breed of the Northeast is one of the great responsible for the man's fixation in the field, however this practice is being threatened by several illnesses, including Maedi/Visna. The development of this work happened after the serological proof of the Maedi/Visna disease in the sheep's flock from Northeastern, where to verify to real existence of the Maedi/Visna Virus (MVV), this should be diagnosed by other virological techniques. Then an seropositive animal by the test in Agar Gel of Immunodiffusion, native of the Northeast area of Brazil, was used, from where it was obtained the blood that contained infected cells and it was made the cocultivo with fibroblasts cells for viral multiplication. MVV obtained starting from the cocultivo, they were purified and tested with relationship your presence for the test of Electron microscopy, as the monocytes visualization infected by the immunoperoxidase technique, for the test of ELISA where native MVV was tested in comparison with standard MVV (strand k1514) with standard IgG, and for the eletroforesis technique in poliacrilamide gel with SDS (SDS-PAGE) to determine the main proteins bands that it contained the virus in relation to viral standard protein gp 135. This way, in all the developed techniques they were found the most expressive values as results, that is, particle characteristic viral; infected monocytes and evidenced by the peroxidase, ELISA of suitable native MVV with standard MVV and protein band similar. Like this, MVV is really present in the sheep's flock of the Northeast.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	14
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Ovinocultura no Nordeste	16
2. Características da Doença	16
3. O Agente Etiológico	17
4. Diagnóstico	19
5. Técnicas Sorológicas	21
5.1. Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)	21
5.2. ELISA	22
6. Técnicas Viroológicas	23
6.1. Isolamento Viral	23
6.1.1 Purificação por Ultracentrifugação	24
6.2. Eletroforese	24
6.3. Imunoperoxidase	25
6.4. Microscopia Eletrônica	26
6.4.1. Contrastação Negativa	27
JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVOS	29
Objetivo Geral	29
Objetivos Específicos	29
EXPERIMENTOS REALIZADOS	30
Artigo 1. Isolation of Maedi/Visna in cocultive and its identification through electron microscopy and immunoperoxidase technique.	31
Artigo 2. Evidence of the Maedi/Visna in the Northeast of Brazil, Diagnosed by SDS-PAGE technique and ELISA.	43
CONCLUSÃO GERAL	54
PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - percentagem

SRD – Sem raça definida

MVV – Vírus Maedi/Visna

RNA – Ácido ribonucléico

AIEV – Vírus da Anemia Infecciosa Equina

CAEV – Vírus da Artrite Encefalite Caprina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

BIV – Vírus da Imunodeficiência Bovina

FIV - Vírus da Imunodeficiência Felina

SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia

JDV – Vírus da Doença de Jembrana

IFN – Interferon

linfócitos T CD<sub>4</sub> – Linfócitos T Auxiliadores

nm – Nanômetro

Mg<sup>2+</sup> - Íon Magnésio

kDa - Quilodalton

gp – Glicoproteína

IDGA – Imunodifusão em Gel de Agarose

OIE – Organização Internacional de Epizootias

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

ME – Microscopia Eletrônica

EIA – Ensaio Imunoenzimático

IF – imunofluorescência

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

µg – Microgramas

mL – Mililitros

ng – Nanogramas

Ag – Antígeno

Ac - Anticorpo

Ig – Imunoglobulina

p-nitrofenilfosfato – Para-nitrofenilfosfato

OPD -o-fenilenodiamino – Orto-fenilenodiamino

ABTS – 2-2 azino-di-3-etabenzotiazolino sulfonado – 6 ou sal diamônio

NaOH – Hidróxido de Sódio

M – Molar

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Ácido Sulfúrico

N – Normal

EDTA – Etileno-diamino-tetra-acético

ECP – Efeito Citopático Característico

C – Aceleração angular

π – aproximadamente 3,1416

rpm – Rotações por minuto

δs – Distância da molécula ao eixo de rotação

v – Velocidade

r – Raio

d – Densidade da molécula

d<sub>o</sub> – Densidade do líquido

n – Viscosidade do meio

S – Coeficiente de Svedberg =  $10^{-13}$ seg  
 $\omega$  – Velocidade angular do rotor em radianos/segundos – 0,10472rpm  
 $dr/dt$  – Razão do movimento da partícula  
FCR – Força Centrífuga Relativa  
g – Gravidade  
 $\mu$  - Mobilidade eletroforética  
V – Velocidade da partícula  
P – Potencial elétrico  
Z – Carga da molécula  
f – Coeficiente de fricção  
SDS - Duodecil Sulfato de Sódio  
Y – Razão entre a distancia da migração da banda protéica e distância da porção  
dianteira da banda protéica.  
X – Logaritmo do peso molecular  
DAB – Diaminobenzidina  
 $\nu$  - Freqüência  
E – Energia  
h – Constante de Planck  
 $\lambda$  – Comprimento de onda  
 $p$  – Momento  
 $\sqrt{\quad}$  - Raiz quadrada  
U – Potencial de aceleração aplicado  
⊙ - Angstroms =  $10^{-10}$ m  
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão  
PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

## LISTA DE FIGURAS

Artigo I – Fig 1. Visualization through electron microscopy...	41
Artigo I – Fig 2. Visualization through microscopy of the immunoperoxidase...	42
Artigo II – Fig 1. SDS-PAGE of the protein MVV...	52
Artigo II – Fig 2a. Values of the test of ELISA – MVV K1514...	53
Artigo II – Fig 2b. Values of the test of ELISA – MVV test...	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades virais detectadas por diversos testes diagnósticos...	20
Tabela 2. Comparação das propriedades virais nos diferentes testes diagnósticos...	20
Tabela 3. Sensibilidade na detecção de antígenos através de diferentes técnicas sorológicas...	21
Tabela 4. Enzimas e substratos utilizados comumente no teste de ELISA e respectivos comprimentos de onda para avaliação da absorvância...	23

## **INTRODUÇÃO**

O Nordeste brasileiro tem como um dos principais motivos para fixação e a manutenção do homem em seu semi-árido a prática da ovinocultura, porém esta atividade está sendo ameaçada por problemas sanitários disseminados nesta região do país, inclusive enfermidades oriundas de outras nações, tal como a provocada pelo vírus Maedi/Visna (MVV), o qual foi introduzido na região através da importação de animais puros de origem, visando o melhoramento genético e, conseqüentemente, o aumento da produção.

Este vírus provoca grande debilidade ao ovino, com transtornos multissistêmicos, onde os principais sintomas são pneumonia progressiva e problemas neurológicos e, dependendo do número de animais acometidos, o prejuízo econômico na ovinocultura do Nordeste, poderá atingir graves proporções.

Desta forma, com os dados obtidos através de pesquisas que ressaltem a verdadeira existência do vírus e da doença em nossa região, seja através de levantamentos sorológicos no rebanho ovino, isolamento do agente e identificação do mesmo por verificação da morfologia viral, da presença de proteínas virais condizentes, além da presença nos tecidos de vírus reativos, é necessário elaborar um programa profilático eficaz para o controle desta doença, já que atualmente não há mecanismos de cura efetiva.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Ovinocultura no Nordeste:

A ovinocultura surge como fonte alternativa na atividade pecuária, especialmente sobre a produção de carne para o consumo humano e o comércio industrial de peles. Atualmente o rebanho ovino no Brasil conta com cerca de 18.177.105 cabeças, sendo 41,2% produzidos na região Nordeste (IBGE/Ministério da Agricultura, 1997).

As raças ovinas no Nordeste são predominantemente deslanadas (Figueiredo *et al.*, 1980) ou sem raça definida (SRD), e a exploração econômica dos derivados desta espécie tornou-se fator importante para fixação e manutenção do homem no semi-árido nordestino, contribuindo, em grande parte, para sua renda mensal (Sousa, 1992).

Entretanto, para obter-se a maximização do desfrute do potencial produtivo e reprodutivo dos rebanhos ovinos existentes na região Nordeste, é necessário, estabelecer programas de investigação sanitária, principalmente daquelas que se propõem a diagnosticar doenças até então consideradas exóticas, e que com a difusão em nossa região de animais melhorados geneticamente, a probabilidade de tais enfermidades existirem e se tornarem endêmicas, aumentou.

### 2. Características da Doença:

Uma das principais enfermidades consideradas exóticas são as lentivirose de pequenos ruminantes.

A doença nos ovinos é denominada Maedi/Visna em muitas partes do mundo, onde o termo Maedi em islandês significa dispnéia, descrevendo assim uma pneumonia intersticial crônica, e Visna que tem como significado demência, referindo-se a uma inflamação crônica e progressiva do sistema nervoso central resultando em paresia e paralisia (Petursson *et al.*, 1992). Nos Estados Unidos, a doença é comumente conhecida como Pneumonia Progressiva Ovina. Na África do Sul o nome é doença de Graaff-Reinet, na França la bouhite e na Holanda Zwoergerziekte (Bulgin, 1990; Petursson *et al.*, 1992).

A primeira descrição da enfermidade ocorreu na África do Sul por Mitchell em 1915, e Marsh descreveu-a nos Estados Unidos mais precisamente no estado de Montana, no ano de 1923 sendo no Brasil o primeiro relato em ovinos feito por Dal Pizzol *et al* (1989).

A lentivirose ovina é uma doença multissistêmica, onde as lesões são caracterizadas por infiltração de células mononucleares e linfoproliferação (Brodie, *et al.* 1998).

Os ovinos geralmente exibem sinais da doença após o segundo ano de infecção, sinais estes denotados por respiração laboriosa, perda de peso, intolerância a exercícios, fadiga, mastites, artrites, vasculite em pequenas artérias renais, além de lesões pulmonares, articulares e nervosas (Cutlip, *et al.* 1988).

São observadas lesões testiculares, e quando acompanhado de outros problemas no aparelho reprodutivo como Brucelose, podem contribuir para a transmissão venérea da enfermidade (de la Concha-Bermejillo, *et al.* 1996). Porém as principais formas de transmissão da enfermidade são através da ingestão de leite e colostro contaminados com o vírus, e ainda menos freqüentemente por contato direto com secreções diversas oriundas de animal infectado.

### 3. O Agente Etiológico:

O causador da lentivirose ovina é um vírus denominado de Maedi/Visna vírus (MVV) que pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus* que juntamente com os demais Lentivírus (AIEV, CAEV, HIV, BIV, FIV, SIV e JDV) têm seu genoma constituído de RNA fita simples (Narayan & Clements, 1989).

Estes vírus infectam células do sistema imune (linfócitos T CD<sub>4</sub> e/ou da linhagem monócito/ macrofágica) onde fazem sua replicação (Narayan & Cork, 1985). Possuem um longo período de incubação e um desenvolvimento progressivo que compromete um ou vários órgãos (Narayan & Cork, 1985).

O Visna e Maedi apresentaram os primeiros surtos produzindo uma doença lentamente progressiva e fatal, incluindo síndromes debilitantes acompanhadas de degeneração do sistema nervoso (Haase, 1986).

Pesquisas em animais positivos evidenciaram que as células macrofágicas são as principais células hospedeiras (Narayan *et al.*, 1982; Gendelman *et al.*, 1986), mas a replicação ocorre apenas em macrófagos nos tecidos onde há desenvolvimento de lesões inflamatórias (Gendelman, *et al.* 1985; Kennedy, *et al.*, 1985). *In vivo*, a replicação do MVV em células da linhagem macrofágica é restrita a pequenas quantidades de proteínas virais detectáveis, embora muitas cópias de RNA viral possam estar nas células-alvos (Haase *et al.*, 1977; Gendelman *et al.*, 1986). Esta restrição pode ser devido ao tipo de célula infectada (macrófago), estágio de maturação das células-alvo, produção de interferon (IFN-lentivirus), além de outras citocinas.

O MVV é uma partícula envelopada com diâmetro variável entre 80-100 nm apresentando a enzima transcriptase reversa dependente de  $Mg^{2+}$  (Dubois - Dalec *et al.*, 1976), e que possui em seu RNA, genes estruturais e reguladores.

Os genes estruturais são arranjados em cadeia da região inicial 5' à região terminal 3', sendo estes genes *gag*, *pol* e *env* (De Martini *et al.*, 1991). O gene *gag* é um gene de 50 – 57 kDa precursor de três principais proteínas: Matriz (MA), capsídeo (CA) e nucleocapsídeo (NC) (Brodie *et al.*, 1993; Kwang *et al.*, 1996).

A proteína MA (15 - 17kDa) é essencial para gerar e montar os virions infecciosos (Rhee *et al.*, 1987) e está localizada entre o envelope viral e o capsídeo protéico. As proteínas CA (24 - 27kDa) são de centro hidrofóbico, no virion são abundantes e elicitam uma resposta ativa dos anticorpos durante a infecção. A proteína NC é essencial para aglomerar o RNA viral e dispensável para a produção da partícula viral (Wills *et al.*, 1991).

O gene *pol* contém informações sobre diversas enzimas importantes na transcrição do ácido nucléico viral e síntese protéica durante a replicação (Brodie *et al.*, 1998). O gene *env* é responsável pela formação das glicoproteínas do envelope que se encontram na superfície viral chamadas de gp105 e gp55 (Brodie *et al.*, 1998). Quanto ao gene *tat* este poderá contribuir pela patogenicidade das manifestações proliferativas nos diversos

órgãos, além de, possivelmente, causar lesões no sistema nervoso central (Philippon *et al.*, 1994; Vellutini *et al.*, 1994). O gene *tat* e os demais genes de regulação: *vif* e *rev* são encontrados entre os genes *pol* e *env*, e as proteínas traduzidas a partir destes ativam avidamente a replicação viral (Narayan & Clements, 1989).

#### 4. Diagnóstico:

A identificação de animais positivos é realizada no mundo todo, principalmente por meio de exames sorológicos como a Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), devido a sua alta especificidade e praticidade, essa técnica é a indicada pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) para diagnóstico de lentivirose de pequenos ruminantes, especialmente Maedi/Visna. Entretanto, esta técnica possui um valor limitado na identificação de animais em fase inicial de infecção (Brodie *et al.*, 1998), pois a sensibilidade deste teste é considerada baixa (Crawford *et al.*; 1980; de la Concha Bermejillo, 1997).

Assim, atualmente utiliza-se de técnicas para diagnóstico que possuam boas especificidade e sensibilidade, sejam elas sorológicas e/ou virológicas como: o isolamento do vírus e sua identificação morfológica e protéica ou até mesmo de caráter molecular como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que detecta a presença do material genético do agente etiológico, não necessitando de nenhuma resposta do organismo hospedeiro (Barlough, 1994).

Na sorologia, uma detecção de anticorpos contra MVV em fase inicial da doença denota que a acurácia do diagnóstico é amplamente dependente da sensibilidade e da especificidade do teste usado, e pode ser influenciada pela duração da infecção, níveis de viremia, integridade do sistema imunológico do hospedeiro e do fenótipo viral, como fatores de virulência e tendência para variação antigênica (Clements *et al.*, 1988; Lairmore *et al.*, 1988; Narayan & Clements, 1989; Brodie *et al.*, 1993; Brodie *et al.*, 1998).

Os testes virológicos são mais demorados e demandam um maior custo, porém são essenciais para a obtenção de uma maior produção de massa viral, e de se permitir conhecer as propriedades virais quanto as características que os mesmos exercem sobre

as células-alvo e que estes têm em contato com o meio extracelular (TABELA 1;TABELA 2).

TABELA 1. Propriedades virais detectadas por diversos testes diagnósticos (Biel & Madeley, 2001).

Propriedade viral	Detectado por
Estrutura viral	Microscopia eletrônica (ME)
Infectividade	Cultivo celular
Ácido nucléico	Métodos de amplificação de ácidos nucléicos
Antígenos	Ensaio baseado em anticorpos
Enzimas	Ensaio enzimático
Alterações histológicas	Histologia

TABELA 2. Comparação das propriedades virais nos diferentes testes diagnósticos (Biel & Madeley, 2001).

Teste diagnóstico	Especificidade	Serotipagem	Custo	Operador habilitado	Número de espécimes analisados	Tempo	Sensibilidade
ME	Morfologia apenas	Difícil, mas possível	Alto	Sim	Pequeno	<1h	Baixa
Cultivo celular	Cultivo viral	Neutralização apenas	Alto	Sim	Pequeno	2 dias a 1 mês	Alta com células susceptíveis
EIA/IF	Tipo/grupo	Se reagentes disponíveis	Alto/baixo	Não/Sim	Grande	2h (IF), <i>overnight</i> (EIA)	Médio
Amplificação de ácidos nucléicos	Alto	Sim, se reagentes disponíveis	Alto	Sim	Médio	<i>Overnight</i>	Muito alta
Ensaio enzimáticos	Específico	Não	Médio	Sim	Pequeno	<i>Overnight</i>	Baixa
Sorologia	Tipo/grupo	Apenas por neutralização	Baixo	Não, se automatizado	Grande	variável	Alta

## 5. Técnicas Sorológicas:

### 5.1. Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA):

Foi um dos primeiros testes sorológicos que promoveu sucesso no diagnóstico de Maedi/Visna, tendo sido desenvolvido para detectar anticorpos específicos anti-MVV. Embora tenha valor limitado no diagnóstico de animais infectados durante as fases iniciais de infecção quando as concentrações de anticorpos do plasma sanguíneo são baixas (TABELA 3). O IDGA tem relativamente um baixo custo, é comercialmente disponível e de fácil execução, tornando-o assim a técnica de diagnóstico sorológico para Maedi/Visna a mais comumente usada. Porém, estudos sugerem que o teste de IDGA tenha realmente valor limitado nos usos diagnósticos devido a sua pouca sensibilidade (Simard & Briscoe, 1990; Marcom *et al* 1992; Brodie *et al.*, 1993; Knowles *et al.* 1994) sendo, no entanto, ideal para os programas de triagem no controle dos rebanhos, desta forma sendo o indicado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE).

A técnica baseia-se na reação de precipitação que resulta no surgimento de uma linha única de identidade entre o antígeno e o soro do animal testado, tendo como padrão as linhas únicas formadas entre os soros de referência positivos (Cutlip *et al*, 1977).

TABELA 3. Sensibilidade na detecção de antígenos através de diferentes técnicas sorológicas (Almeida & Lima *apud* Van Regenmortel, 2001).

Técnicas sorológicas	Limite de Detecção
Difusão dupla de ágar	2-20 µg/mL
Precipitina	1-10 µg/mL
Imunodifusão radial	0,5-10 µg/mL
ELISA	5-10 ηg/mL
Imunoadsorção em microscopia eletrônica	1-10 ηg/mL

## 5.2. ELISA:

Este teste baseia-se na utilização de imunoglobulina conjugada a uma enzima para detecção de haptenos, antígenos e anticorpos (Payment *et al*, 1979). O uso de enzimas para a marcação tem a vantagem de ser estável, segura e dispensar o uso de equipamentos sofisticados para a visualização da reação. Se a marcação da enzima for feita diretamente no anticorpo a ser usado na detecção do antígeno, o ensaio é tido como direto, ou se a marcação for feita num segundo anticorpo que será utilizado na detecção do anticorpo antígeno-específico é então dito como indireto (Colariccio & Schroeder, 1998).

Kurstak (1985) cita que as vantagens do teste são diversas, como:

- Os reativos marcados têm alta estabilidade, portanto podem conservar-se por longo tempo;
- É permitida uma completa automação;
- Os resultados são objetivos e podem ser obtidos em condições normais de laboratório;
- Os antígenos e anticorpos marcados com a enzima podem ser manuseados em condições normais.

As desvantagens segundo Kurstak (1985), são:

- O custo do teste;
- As diferentes afinidades dos antígenos de aderirem-se à fase sólida (placa).
- Presença de reações inespecíficas.

O Teste de ELISA segue o princípio clássico da sorologia, onde o antígeno é reconhecido pelo anticorpo que lhe deu origem, formando o complexo Ag-Ac, associado a propriedades colorimétricas (TABELA 4). Onde a coloração do meio ocorre devido à ação de determinada enzima sobre um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à imunoglobulina (Ig) (Almeida & Lima, 2001).

Várias enzimas são citadas para a obtenção dos conjugados, entretanto as duas principais são a fosfatase alcalina e a peroxidase (horseadish peroxidase) (Almeida & Lima *apud* Clark & Bar-Joseph, 2001).

TABELA 4: Enzimas e substratos utilizados comumente no teste de ELISA e respectivos comprimentos de onda para avaliação da absorbância (Snyder & Erickson, 1981):

Enzima	Substrato	Solução de parada	Comprimento de onda (nm)
Fosfatase alcalina	p-nitrofenilfosfato	NaOH 10M ou 3M	405
Peroxidase	o-fenilenodiamino (OPD)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2,5M ou 3N	492
	ABTS	EDTA, NaOH 1N	405
	5-aminosalicílico	NaOH 2N	492

## 6. Técnicas Viroológicas:

### 6.1. Isolamento Viral:

Este método é de grande sensibilidade para alguns agentes virais e consiste em por em contato o material infectado com cultivos celulares susceptíveis *in vitro*, para que o vírus se multiplique e possa ser detectado através da presença de efeito citopático característico (ECP), ofertando-se aos cultivos susceptíveis condições semelhantes quanto às propriedades físicas, químicas e nutricionais ao encontrado *in vivo*.

Em tecidos não infectados há poucos exemplos de sincícios que aconteçam naturalmente. Isto é devido indubitavelmente às condições histológicas e fisiológicas extremamente especializadas que em geral teriam que ser criados para manter suas viabilidades (Philips, 1970).

*In vivo*, o sincício ocorre nas desordens patológicas (Chambers, 1978), particularmente em tumores e doenças de origem viral. Significativamente, o aparecimento

em macrófagos pode está envolvido em muitas instâncias infecções inflamatórias pulmonares e quando com comprometimento de células da glia em infecções por vírus do gênero *Lentivirus* (Sharer *et al*, 1985; Takeya *et al*, 1991; Harris, 1993).

Desta forma, *in vitro*, células infectadas com lentivírus têm a propriedade de induzir a fusão celular e posterior formação de sincício em células não infectadas pelo vírus, porém se unem através de receptor para a glicoproteína de superfície que a célula infectada possui (Daniel *et al*, 1984; Gonda *et al*, 1987). Posteriormente, os sincícios tendem a se dissociar ou desintegrar, sendo o monitoramento diário um fator crítico na observação da formação do sincício (Pawlisch & Maes, 1984).

Assim, para obter-se o material viral replicado, após o surgimento do ECP faz-se a purificação viral, onde a ultracentrifugação é uma das principais técnicas de obtenção.

#### 6.1.1. Purificação por Ultracentrifugação:

Antes de tudo, é sabido que partículas em suspensão podem ser separadas por qualquer velocidade de sedimentação, ou através de equilíbrio de sedimentação. Na velocidade de sedimentação por ter velocidade baixa e tempo curto, há separações de partículas incompletas. Já no equilíbrio de sedimentação, onde há alta velocidade e maior tempo, ocorre à separação completa das partículas (Heidcamp, 1996).

Assim, as moléculas são separadas de acordo com o tamanho, forma, densidade, viscosidade e força centrífuga, obedecendo às equações (Heidcamp, 1996):

$$C = 2\pi (\text{rpm})^2 \delta s / 60^2$$

$$\text{Onde: } v/C = 2/9 r^2 (d-d_0)/n$$

$$S = v/C = 1/ \omega^2 r. dr/dt$$

$$\text{FCR (g)} = 11,17 \times \text{raio da centrífuga} \times (\text{rpm}/1000)^2$$

#### 6.2. Eletroforese:

Pode ser a técnica principal para separação molecular, porque é uma técnica precisa e razoavelmente fácil e pouco onerosa. Apesar dos muitos arranjos físicos para o

aparato, e embora o meio pelo qual são permitidas moléculas migrar, todas as separações por eletroforese dependem da distribuição de cargas das moléculas que se está separando. Porém, a eletroforese é especialmente útil como um método analítico. Sua vantagem é que proteínas podem ser visualizadas separadas, permitindo para um investigador calcular o número de proteínas diferentes rapidamente em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação protéica particular. Também, permite a determinação de propriedades cruciais de uma proteína como seu ponto isoelétrico e o peso molecular aproximado (Nelson & Cox, 2000).

A eletroforese é geralmente desenvolvida em géis compostos de polímeros poliacrilamida (acrilamida e bis-acrilamida) entrelaçados. O gel de poliacrilamida age como uma peneira molecular, reduzindo a velocidade de migração das proteínas em relação à carga da massa (Nelson & Cox, 2000).

Desta forma a eletroforese obedece a seguinte equação:

$$\mu = V/P = Z/f$$

O método eletroforético comumente empregado para estimar a pureza e o peso molecular protéico utiliza o detergente Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) (Nelson & Cox, 2000).

Quando os pesos moleculares de várias proteínas padrões forem conhecidos, as suas mobilidades podem ser analisadas como uma função de peso molecular dada a uma curva de calibração linear, de acordo com a relação distância/logaritmo do peso molecular, onde:

$$Y = aX + b$$

### 6.3. Imunoperoxidase:

Esta técnica permite a detecção imunológica de antígenos virais presentes em cultivos celulares. Possui o mesmo princípio da Imunofluorescência podendo ser empregada com certas vantagens, segundo Romero (1989):

- A leitura dos resultados se dá através de microscópio ótico;

- As preparações são permanentes;
- Possui uma maior sensibilidade e especificidade.

Pode ser realizada sob as formas de peroxidase indireta e direta semelhantemente ao ELISA, utilizando-se o DAB como substrato.

#### 6.4. Microscopia Eletrônica:

A investigação biológica foi incrementada extraordinariamente em suas possibilidades com o emprego da microscopia eletrônica, onde o microscópio eletrônico é um instrumento que aproveita o comprimento de onda extremamente curto de um feixe de elétrons, permitindo obter níveis de resolução significativamente melhores que os microscópios óticos (Almeida & Lima, 2001).

Desta forma, as novas estruturas e seus componentes moleculares tem aparecido com a ajuda de microscópio eletrônico, abrindo assim novos campos de interpretação, tanto das células, quanto de organelas e outras minúsculas partículas. Os conhecimentos das ultraestruturas morfológicas, química e física são os pilares estruturais da compreensão da funcionalidade dos materiais, sejam eles biológicos ou não (Gonzalez-Santander, 1969).

Assim, o físico Louis de Broglie em sua tese de doutorado, propôs a existência de ondas associadas à matéria (Eisberg & Resnick, 1974), onde uma vez que a luz tinha propriedades ondulatórias e corpusculares, talvez a matéria, especialmente os elétrons, também tivessem características de ondas e partículas. Desta forma, ele hipotetizou duas equações:

1.  $v = E/h$

2.  $\lambda = h/p$

Onde, um elétron é acelerado através de uma diferença de potencial no interior do microscópio eletrônico, sendo, portanto sua energia cinética final gerada pelo potencial de aceleração do microscópio. Então:

$$E_{\text{cinética final do elétron ao passar pelo anôdo}} = E_{\text{potencial do elétron no momento em que é ejetado do filamento}}$$

$$\text{Assim: } \lambda = 12,3/\sqrt{U} \text{ \AA}$$

Com isto houve o desenvolvimento dos microscópios eletrônicos e de suas técnicas.

#### 6.4.1 Contrastção Negativa:

O processamento clássico em microscopia eletrônica de transmissão por embocamento de material e respectivos cortes ultrafinos é aplicável a observações *in situ* de vírus e outras pequenas estruturas pequenas, estando limitado porém à sua representação bidimensional. Assim, é indispensável ao visar à estrutura principalmente de partículas virais, o preparo de amostras por meio da denominada contrastção negativa (Brenner & Horne 1959).

Pequenas partículas em suspensão são examinadas em microscopia eletrônica de transmissão após sua contrastção negativa, que consiste no envolvimento destes elementos por meio elétron-denso, de modo que suas imagens apresentam-se como um negativo, onde o elemento fica claro, mais transparente aos elétrons que o fundo da preparação (Barth, 1998).

Suspensões densas e complexas de vírus levam a relação entre uma diluição apropriada e a perda do título de vírus nelas contidos; com o emprego de um contrastante adequado o “contraste de fundo”, ao mesmo tempo em que partículas virais fiquem evidenciadas (Barth, 1998).

O insucesso no uso da contrastção negativa visando um diagnóstico reside na preparação das suspensões virais. A precipitação das partículas em suspensão, seguida por centrifugação em série e ultracentrifugação limpa bem o material a ser observado, mas com cada etapa de purificação efetuada torna-se mais difícil à execução de preparações destinadas à microscopia eletrônica. A razão deste fato reside na repulsão de cargas elétricas entre a superfície da grade de cobre recoberta com formvar ou colódio e a gota de suspensão (Barth, 1998).

## **JUSTIFICATIVA**

Depois da comprovação sorológica da presença de ovinos positivos para Maedi/Visna após levantamento realizado na região metropolitana de Fortaleza, viu-se a necessidade de comprovar a existência do vírus através de cultivo celular, e sua posterior identificação microscópica e de sua morfologia, além de verificar paralelamente através de técnicas apropriadas esta real existência, contribuindo desta forma para um melhor esclarecimento quanto à presença do vírus na região Nordeste, a fim de elaborar um programa profilático cuja finalidade será evitar a disseminação do vírus.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo Geral

Isolar e identificar vírus do gênero *Lentivirus* ovino de animais comprovadamente soropositivos pelo IDGA.

### Objetivos Específicos

Isolar lentivirus ovino provenientes de monócitos do sangue através do cultivo de macrófagos e fibroblastos primários homólogos.

Identificar a morfologia, o diâmetro, tipo de capsídeo, através de microscópio eletrônico de transmissão (MET).

Identificar através da técnica de imunoperoxidase a existência de células da linhagem monócito/macrofágica infectadas.

Utilizar o vírus obtido como Antígeno em teste de ELISA comparando-o com o vírus padrão de Maedi/Visna K1514.

Comparar através de corrida eletroforética pela técnica de SDS-PAGE a equivalência entre as proteínas do vírus obtido e a proteína padrão gp135 do MVV.

## **EXPERIMENTOS REALIZADOS**

**ARTIGO 1:** ISOLATION OF MAEDI/VISNA IN COCULTIVE AND ITS IDENTIFICATION THROUGH ELECTRON MICROSCOPY AND IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE

**ENVIADO A PUBLICAÇÃO:** RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

**ISOLATION OF MAEDI/VISNA IN COCULTIVE AND ITS IDENTIFICATION THROUGH  
ELECTRON MICROSCOPY AND IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE**

**Ney de Carvalho ALMEIDA <sup>a</sup>; Maria Fátima da Silva TEIXEIRA <sup>\*a</sup>; José Albérico  
Araújo Lima<sup>b</sup>; Livia Maria Nogueira de Castro<sup>a</sup>; Cesarino Junior Lima APRIGIO <sup>a</sup>;  
Adriana Lopes RIBEIRO <sup>a</sup>**

**<sup>a</sup> *Virology Laboratory, Veterinary Faculty, State University of Ceara, Paranjana***

***Avenue 1700, Fortaleza, Ceara, Brazil***

**<sup>b</sup> *Fitovirology Laboratory, Agriculture Science Center, Federal University of Ceara,***

***Mister Hull Avenue s/n, Fortaleza, Ceara, Brazil***

**Abstract**

The disease provoked by Maedi/Visna virus is of a nervous and/or respiratory character and was considered exotic in the northeast area of Brazil, which is an important nursery of sheep in the country, in its largest part composed of native sheep. Serological surveys were carried out showing a great incidence of such disease. Thus, the execution of the viral isolation was performed in cocultive. The infectious agents, in this case the Maedi/Visna virus, were identified through both electron microscopy and visualization of infected monocytes using the immunoperoxidase technique. The presence of CPE for Maedi/Visna virus was verified in cocultive. In addition to that, viral particles of 80nm of diameter and monocytes with a peroxidase-positive reaction were also verified.

**Key words:** Maedi/Visna virus, cocultive, electron microscopy, immunoperoxidase

\*Corresponding author:

Address: Paranjana Avenue 1700 - Campus do Itaperi - Fortaleza/Ceara - Brazil

ZIP: 60740-000

Telephone: 0055-85-2992749

Fax: 0055-85-2992740

e-mail: mfteixeira@hotmail.com

## Introduction

The Maedi/Visna virus causes neurological and/or respiratory problems in the ovine it attacks (Narayan and Cork, 1985). It belongs to the *Retroviridae* family and to the *Lentivirus* genus, and is characterized by the presence of a double RNA of simple strand in addition to the reverse transcriptase enzyme.

The main host cells to MVV are macrophages (Narayan *et al.*, 1982; Gendelman *et al.*, 1986). The viral multiplication happens mainly in these cells in the tissues where the inflammatory lesion develops (Gendelman *et al.*, 1985; Kennedy *et al.*, 1985). The *in vivo* multiplication of MVV occurs in restricted macrophages and only a small amount of protein may be detected, although many copies of viral RNA can be found in the host cell (Haase *et al.*, 1977; Gendelman *et al.*, 1986).

In cellular cultivation, the infections result in cellular coalition (syncytium) or degeneration (lise). In many organs, infected macrophages presented antigens later in their inflammatory response (Narayan and Clements, 1989). In spite of their multiplication *in vitro*, macrophages present a small cytopathic effect (CPE) that is not always evident (Narayan *et al.*, 1982, Lairmore *et al.*, 1987). Thus, a cocultive with fibroblastic cells is necessary so that they can express a characteristic cytopathic effect (CPE) – in this case, syncytium formation.

The MVV is an enveloped particle of variable diameter ranging from 80 to 100nm, which presents the enzyme transcriptase reverse dependent of Mg<sup>2+</sup> (Dubois – Dalec *et al.*, 1976). It contains in its RNA structural and protein regulator genes. The fibroblastic cells are most commonly used in studies of the MVV using electron microscopy.

The electron microscopy displays only the morphology of the viral particle and the identification of the viral stereotype is difficult, but possible. It is a test that can be carried out quickly. However, it has a very low sensibility (Biel and Madeley, 2001).

Among the enzymatic assays, the immunoperoxidase is a highly specific diagnostic technique, although it presents lower sensibility in most of the tests with virus (Biel and Madeley, 2001). The purpose of this work was to isolate fibroblasts in cocultive with MVV monocytes, thus enabling the virus identification through electron microscopy and immunoperoxidase techniques, evidencing the presence of the virus in the Brazilian northeast sheep flock.

## **Materials and Methods**

### **1. Positive Animal:**

A positive sheep (originally from the metropolitan area of Fortaleza, in the northeast of Brazil) was obtained from serological follow-up previously carried out using the Agar Gel Immunodifusion (AGID) technique.

### **2. Cell Culture:**

Sheep fibroblastic cells were prepared from the synovial membrane of non-defined ovine races through explantation of small pieces. All cultures were grown in plastic flasks using Minimum Essential Medium (MEM) with 10% of calf fetal serum (CFS) and incubated at 37°C. The medium contained 100 units of penicillin and 100µg of streptomycin per millilitre and 50µg of amphoterycin B.

### **3. Obtaining of Infected Monocytes:**

Positive sheep blood was harvested and was centrifuged (3000g/15min) to obtain the leukocytes layer. To the leukocytes was added distilled water with the purpose of still provoking the lise of hemolise remainders through the centrifugation (3500g/5min). The precipitate obtained was resuspended in RPMI-1640 Medium and part placed in holes in slides for the adaptation of the immunoperoxidase technique and it leaves placed on fibroblasts monolayer and both incubated to the (37°C/60min).

#### 4. Cocultive:

The infected monocytes were placed on the monolayer of non-infected fibroblasts to express CPE, evidencing the presence of the virus and its multiplication. The maintenance medium in the cocultive consisted of MEM with 2%CFS and incubated at 37°C until the disappearance of the CPE in the fibroblasts. With the disappearance, the supernatant was harvested and it leaves of him it was placed again on the fibroblasts monolayer for a larger production viral and other part was addressed the purification. The maintenance medium also contained 100 units of penicillin and 100µg of streptomycin per milliliter and 50µg of Amphoterycin B.

#### 5. Virus:

An “unknown strain” of Maedi/Visna virus was obtained after purification through ultra centrifugation (122,300g/90 min) in discontinuous sucrose gradient (30-50%) (Ellis *et al.*, 1985) using a Beckman L7-55 ultra centrifuge. The bands containing the virus were selected for electron microscopy identification.

#### 6. Preparation of Electron Microscopy:

The preparation process for the electron microscopy consisted of the band being fixed in glutaraldehyde 2% (Standard Buffer) for one hour. The fixed suspension was stained with uranyl acetate for three minutes in cooper grids with 400 meshes. The visualization of the virus was accomplished in a transmission electron microscope (Philips model EM208).

#### 7. Immunoperoxidase:

In order to place monocytes onto the microscope slide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% was added for five minutes. The slide was then washed five times with phosphate buffer solution (PBS).

Gelatin 1% was added for five minutes to the block and the slide was washed five times with PBS. Monocytes were incubated with specific positive serum for Maedi/Visna (IgG anti-gp135), or specific negative serum, for 30 minutes and then they were incubated with monoclonal serum of goat anti-sheep IgG 1:5000 (Sigma Chemical Co.) for one hour. The slide was washed five times in a PBS and monoclonal serum of rabbit anti-goat IgG peroxidase conjugate 1:200 (Sigma Chemical Co.) and incubated for one hour. Therefore, the reaction was revealed by the addition of diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) (Sigma Chemical Co.) for 10 minutes and later the slide was washed many times and negative stained by Giemsa to improve the visualization on the optic microscope of the possible monocytes with a positive reaction to immunoperoxidase.

## **Results**

Synovial membrane cells incubated with maintenance medium at 37°C for 12 days served as control cultures to be compared with infected cultures of “unknown strain” Maedi/Visna virus.

The non-infected fibroblasts in culture did not show CPE. In the co-culture, the presence of the CPE was verified about 36 hours after its beginning, with evident lise zones and the formation of syncytium containing more than six nuclei, and the total disappearance of the monolayer at the end of 11 days.

The ultra centrifugation of the viral supernatant showed the presence of viral bands equivalent in the sucrose gradient to a density of 37%.

Small elliptical particles of 80nm of diameter were observed in the electron microscope. The “unknown strain” Maedi/Visna particles contained a dense centre, slightly eccentric, surrounded by a limiting membrane. The capsid's form was similar to a hexagon. (Fig.1).

Another type of virus was found, similar to an adenovirus: spherical, enveloped, with 150nm of diameter and probable “projections”. (Fig.1).

Few monocytes were labelled in the immunoperoxidase reaction. A characteristic stain of brown colour was observed on the whole cell, evident in the slide in which IgG anti-gp135 was added, not appearing in the negative control (Fig.2).

## **Discussion**

The absence of CPE in the fibroblasts culture was indicative of non-infected original cells from non-infected animals for MVV.

The fibroblasts-monocytes culture technique proved to be a good choice in detecting the presence of the MVV virus. This is due to the fact that in the main multiplication cells, monocyte/macrophage lineage cells, the virus's presence cannot be detected, being of highest importance the presence of the fibroblasts so that the CPE takes place *in vitro*, according to Narayan *et al.* (1982).

In the ultra centrifugation, the appearance of viral bands in the equivalent portion of 37% in the sucrose gradient indicated that the density of the virus is 1.15g/ml, similar to the virus density of the small ruminant's lentivirus as was described by Ellis *et al.* (1985).

The visualization of few virus particles indicated a low viral concentration that could have been more carefully detected by the immunomicroscopy technique as described by Barth (1998). However, morphological characteristics suitable with small ruminant lentivirus, possibly MVV, were noticed in the few evidenced particles, due to CPE shown in the co-culture *in vitro*, in agreement with Coward *et al.* (1970).

The immunoperoxidase technique was successfully performed, revealing the presence of the virus in monocytes. Considering that, according to Adams (1979), these cells possess the peroxidase enzyme, it is of major importance that this enzyme should be eliminated in order to avoid false-positive results. The immunoperoxidase seems to be a good technique for diagnosis, although studies fail to determine its specificity and sensibility, as well as its viability in terms of cost and quickness of execution, in order to establish its future use in screen diagnosis for virus in the genus *Lentivirus*.

As a result of this study, the existence of the Maedi/Visna virus was evidenced in native ovine flocks in the northeast of Brazil. It is now necessary to trace the genetic sequence in order to verify the origin of the disease in this specific region.

### **Acknowledgments**

We are indebted to Dr. José Rafael Rosito Coiro and the members of the Laboratory of Electron Microscopy of the Brazilian Lutheran University (ULBRA) in Canoas, Rio Grande do Sul. Ceará's Research Support Foundation (FUNCAP) supported this work.

### **References**

1. ADAMS, D.O. Cell Culture. *In*: Jakoby, W.B. and Pastan, I.H editors. 1979. Methods in Enzimology, 58 ed, New York: Academic Press Inc., p.494-506.
2. BARTH, O.M. Contrastação Negativa. *In*: Souza, W. editors. 1998. Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica às Ciências Biológicas, 2<sup>a</sup>. ed, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p 45-56.
3. BIEL, S.S.; MADELEY, D. 2001. Diagnostic virology – the need for electron microscopy: a discussion paper. *Journal Clinical of Virology* **22**, 1-9.

4. CHIPPAUX-HYPPOLITE, C.; TARANGER, C.; TAMALET, J. *et al.* 1972. Aspects Ultrastructuraux du virus visna en cultures cellulaires. *Annales Institut Pasteur* **123**, 409-420.
5. COWARD, J.E.; HARTER, D.H.; MORGAN, C. 1970. Electron microscopic observations of visna virus-infected cell cultures. *Virology* **40**, 1030-1038.
6. DUBOIS - DALEC, M.; REESE, T.S.; NARAYAN, O. 1976. Membrane changes associated with assembly of visna virus. *Virology* **74**, 520 - 530.
7. ELLIS, T.M.; WILCOX, G.E. and ROBINSON, W.F. 1985. Characteristics of cell fusion induced by a caprine retrovirus. *Archives of Virology* **86**, 263-273.
8. GENDELMAN, H.E., NARAYAN, O., MOLINEAUX, S. *et al.* 1985. Slow persistent replication of lentiviruses: role of macrophages and macrophages precursors in bone marrow. *Proceedings National Academic Science*. **82**, 7086-7090.
9. GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P.G.E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J.E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *Journal of Virology* **58**, 67-74.
10. HAASE, A.T.; STOWING, L.; NARAYAN, O.; GRIFFIN, D.E.; PRICE, D. 1977. Slow persistent infection caused by visna virus: role of host restriction. *Science* **195**, 175-177.
11. KENNEDY, G.E.P., NARAYAN, O., GHOTBI, Z. *et al.* 1985. Persistent expression of a antigen and viral genome in maedi / visna virus-induced inflammatory cells. *Journal Experimental Medical* **162**, 1970 – 1982.
12. LAIRMORE, M.D.; AKITA, G.Y.; RUSSELL, H.I.; DEMARTINI, J.C. 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with *in vivo* pathogenicity. *Journal of Virology* **61**, 4038-4042.

13. NARAYAN, O.; WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; GRIFFIN, D.E.; CORK, L.C. 1982. Slow virus-replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goat. *Journal General Virology* **59**, 345-356.
14. NARAYAN, O., CORK, L.C. 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. *Veterinary Infectious Disease* **7(89)**, 89-98.
15. NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *Journal General Virology* **70**, 1617 - 1639.
16. THORMAR, H. 1961. An electron microscope study of tissues cultures infected with visna virus. *Virology* **14**, 463-475.

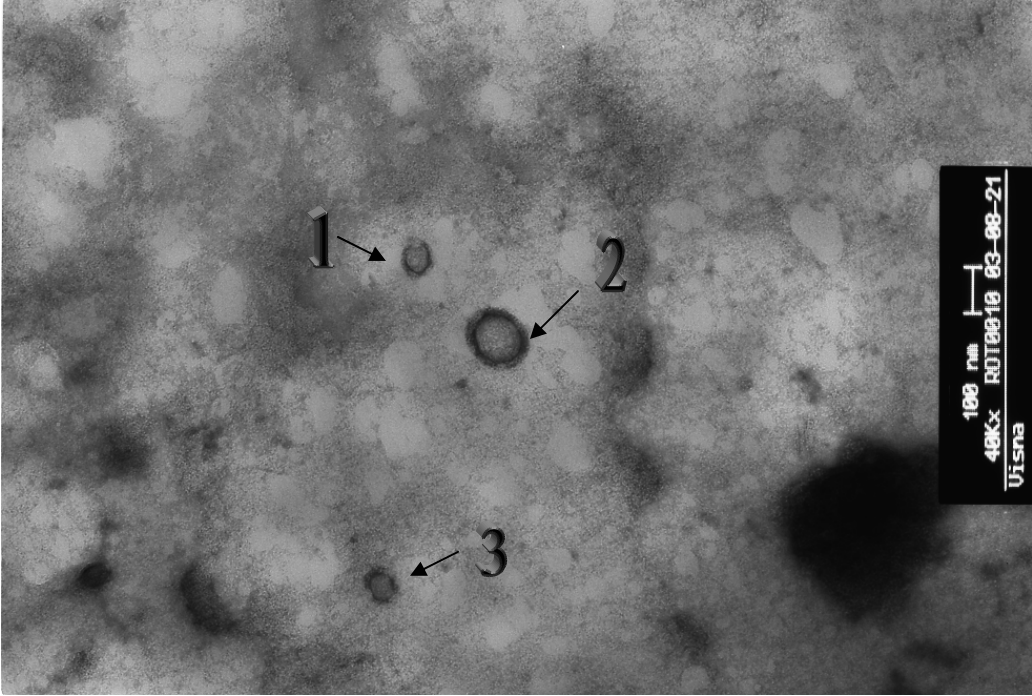


Fig 1. Visualization through electron microscopy - negative stained - of the viral particles. Arrows 1 and 3: MVV, Arrow 2: non identified virus. X 48000.

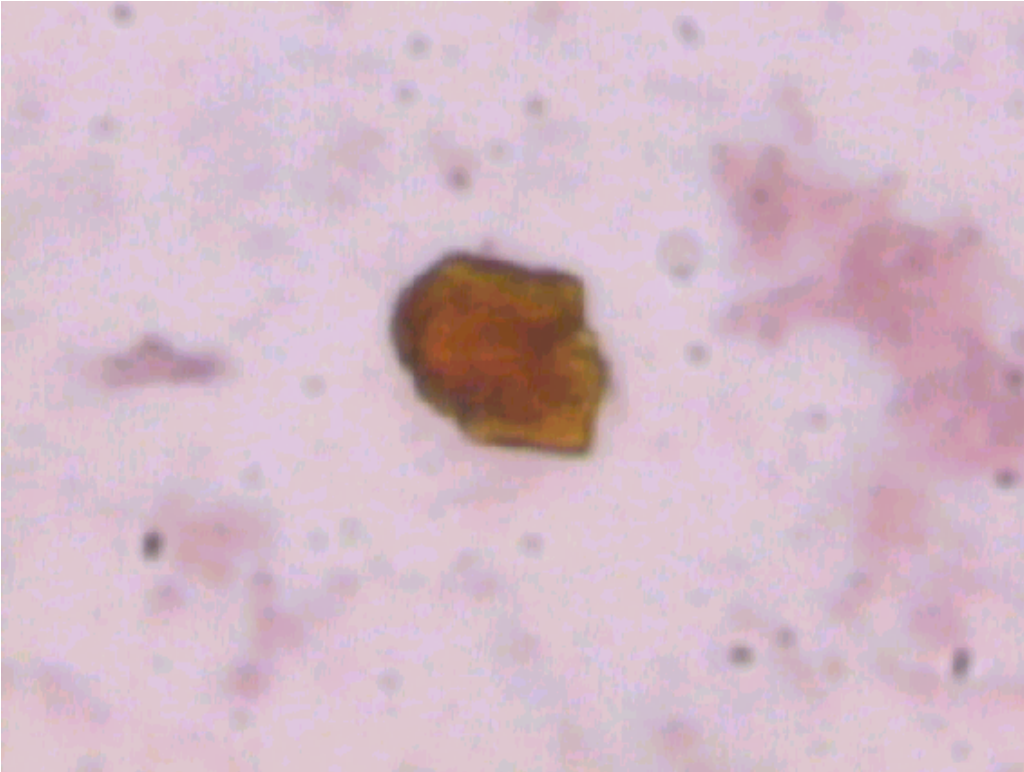


Fig 2. Visualization through light microscopy of the immunoperoxidase reaction in infected monocyte. Observed the brown color characteristic. X 1000

**ARTIGO 2:** EVIDENCE OF THE MAEDI/VISNA VIRUS IN THE NORTHEAST OF BRAZIL,  
DIAGNOSED BY SDS-PAGE TECHNIQUE AND ELISA.

**ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO:** PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE

**EVIDENCE OF THE MAEDI/VISNA VIRUS IN THE NORTHEAST OF BRAZIL, DIAGNOSED BY  
SDS-PAGE TECHNIQUE AND ELISA.**

**Ney de Carvalho ALMEIDA <sup>a</sup>; Maria Fátima da Silva TEIXEIRA <sup>\*a</sup>; Maria Izabel Florindo  
GUEDES <sup>b</sup>; Francisco Jarbas Santos de SOUSA <sup>a</sup>; Cesarino Junior Lima APRIGIO <sup>a</sup>; Adriana  
Lopes RIBEIRO <sup>a</sup>; Marcelo Róseo de OLIVEIRA <sup>b</sup>**

<sup>a</sup> *Virology Laboratory, Veterinary Faculty, State University of Ceara, Paranjana Avenue 1700,  
Fortaleza, Ceara, Brazil*

<sup>b</sup> *Human Biochemistry Laboratory, Health Science Center, State University of Ceara,  
Paranjana Avenue 1700, Fortaleza, Ceara, Brazil*

**Abstract**

Maedi/Visna virus causes a chronic disease in sheep. The major trial test is serological Agar Gel Immunodifusion. The viruses multiply in macrophages in an *in vitro* fibroblasts culture, which shows the cytopathic virus effect after 36 hours. One form of viral purification is an ultra centrifugation. The viral protein characterization can be made with SDS-PAGE. A viral particle can be adapted for the elaboration of the ELISA test, used as an antigen. This study shows evidence that the main isolated viral protein is compatible with MVV's standard protein (gp135) and the isolated viral particle is very similar to the strain standard K1514.

Key words: Maedi/Visna virus, citophatic effect, SDS-PAGE, ELISA.

\*Corresponding author:

Address: Paranjana Avenue 1700 -Campus do Itaperi - Fortaleza/Ceara - Brazil

ZIP: 60740-000

Telephone: 0055-85-2992749

Fax: 0055-85-2992740

e-mail: mfteixeira@hotmail.com

## Introduction

Maedi/Visna virus (MVV) is the prototype virus of the genus *Lentivirus* in the family Retroviridae (Haase, 1986). The virus causes a chronic disease in ovine with three major symptoms: respiratory and neurological problems (Narayan and Cork, 1985; Haase, 1986). Research in serum positive animals evidenced that the macrophages are the main host cells (Narayan *et al.*, 1982; Gendelman *et al.*, 1986), but the virus's multiplication only happens in macrophages in tissues where there is development of inflammatory lesions (Gendelman *et al.*, 1985; Kennedy *et al.*, 1985), despite the virus infecting other cells and compromising, thus, several organs (Narayan and Cork, 1985).

*In vivo*, the multiplication of MVV in macrophage lineage cells is restricted to small amounts of detectable proteins, although many copies of viral RNA can be in the target cells. This restriction may be due to the type of infected cells, their maturation stage, production of lentiviral interferon, and other cytokines (Haase *et al.*, 1977; Gendelman *et al.*, 1986; Philippon *et al.*, 1994). In cellular culture, the infections result in giant multi nucleate cells (syncytium) or cellular degeneration (lise), and in many organs infected macrophages express antigens in the inflammatory response (Narayan and Clements, 1989).

*In vitro*, in spite of the virus multiplication in macrophages, these present a small cytopathic effect (Narayan *et al.*, 1982) or lise of these cells (Lairmore *et al.*, 1987), many times not being evidenced. Thus, a co-culture with fibroblastic cells is necessary so that they can express a characteristic cytopathic effect (CPE), in this case a maximum formation of syncytium in viral peak production (Thormar, 1961; MacIntyre *et al.*, 1973).

The structural viral genome is arranged in a chain from the initial area 5' to the terminal area 3', being these genes *gag*, *pol* and *env* (De Martini *et al.*, 1991). The *env* gene is responsible for the formation of the glycoprotein envelope that covers the viral surface and it is called gp135 with molecular weight of 135kDa (Brodie *et al.*, 1998). After the accomplishment of a serological survey with the purpose of investigating the occurrence of the disease in the state of Ceará in Brazil, it was necessary to try an isolation of the inoculated virus in a macrophages and fibroblasts culture. Then, the viral protein could be identified by Sodium Duodecil Sulphate in Polyacrilamde gel

electrophoresis (SDS-PAGE). Moreover, the viral particle could be adapted as an antigen in the ELISA serological test and compared with the known K1514 virus strain.

## **Materials and Methods**

### 1. Identification of the serum positive animals for MVV:

The Agar Gel Immunodiffusion (AGID) was the test used to identify positive animals. The test was accomplished by using Petri plates (90 x 15mm), in which were deposited agar gel at 1%, antigen gp135 in the central well, and positive standard serum in peripheral wells intercalated with test sera. The antigen/antibody precipitation line reading was performed 96 hours after the beginning of the test.

### 2. Monocytes culture and obtaining viral:

The total blood was harvested from serum positive animal to obtain a white cell layer through two centrifugations (3000g/10 min and 2000g/3 min). The monocytes were cultivated in microplates of 24 wells using RPMI-1640 medium and adding penicillin/streptomycin at 0.1% and amphoterycin B at 0.05% in 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C long enough to allow total cellular maturation or their transformation in macrophages. The macrophages were frozen (-20°C) and defrosted, then ice-cold Phosphate Buffer Solution (PBS) was added containing 0.2% Triton X 100 (Adams, 1979) to induce rupture and liberation of the virus in supernatant.

### 3. Inoculated MVV in monolayer fibroblasts:

The monolayer fibroblasts were obtained from the sinovial membrane of small ruminant fetuses and cultivated with Minimum Essential Medium with 10% of Calf Fetal Serum, penicillin and streptomycin at 0.1%, amphoterycyn B at 0.05% in an atmosphere of 5% of CO<sub>2</sub> at 37°C. The supernatant with MVV was inoculated in fibroblasts for 11 days, and harvested after termination of the CPE.

#### 4. Clarification and MVV purification:

The viral supernatant obtained from fibroblasts was centrifuged (5000g/30 min/4°C) in sucrose at 20% and thus clarified. The ultracentrifugation was carried out with supernatant in discontinuous sucrose gradient (30-50%) at 122,300g for 90 minutes (Ellis *et al.*, 1985). The sucrose gradient fraction containing the virus was harvested and frozen (-20°C) to electrophoresis and ELISA.

#### 5. SDS-PAGE:

The viruses obtained were mixed with sample-buffer (v/v) and ran on 12% main gel with sodium dodecyl sulphate (SDS) in polyacrylamide gel for 3 hours at 150V. Thereafter, the gel was stained with 0.05% Coomassie brilliant blue and destained with 30% of methanol and 7% of acetic acid. In order to determine molecular weight, carbonic anhydrase (29kDa), egg albumin (45kDa), bovine albumin (66kDa), phosphorilase C (94.7kDa) beta galactosidase (116kDa) and standard protein gp135 were used. In the line 1 of the main gel it was placed the proteins with known molecular weight. In the line 9, the standard protein gp135 and in the other lines the sample viral, in a total of 10 lines.

#### 6. ELISA:

ELISA was performed in polystyrene microtitre plates (Corning, Inc.). Antigen "test" and "known" (strain MVV K1514) were added at 100µL in different dilutions per well and incubated at 37°C for three hours. Wells were washed five times with wash's solution (1 x PBS with 0.005% of Tween 20). Standard positive sera were diluted 1:50, 1:200 and 1:1000 in PBS and 100µL added to each well and incubated at 37°C for 2 hours. For the negative control, standard negative sera were used in positive's control same dilutions. After that, the wells were washed five times with wash's solution. Then, 100µL of goat IgG anti-sheep were added per each well and incubated for one hour at 37°C. The washing process followed the same protocol as the previous one. Later, another 100µL of anti-goat immunoglobulin were added conjugated with peroxidase enzyme and the

incubation time was of one hour at 37°C. The wells were washed and substrate solution with OPD was added in volumes of 100µL to each well and the plate was placed in rest for 20 minutes. The results were read using a spectrophotometer by microtitre plates with measuring optical density at 490nm.

## Results

After the AGID test the white precipitation line was verified. Fibroblasts were added to the macrophage culture, and later the virus was inoculated. After 36 hours, both the syncytium with more than 6 nuclei and the cellular lise appeared.

In purification, the viral band was verified in 37-40% of the sucrose gradient. In SDS-PAGE, the purified MVV revealed proteins similar to the standard protein gp135. The test showed a major protein band of 70 kDa (Fig.1).

In ELISA test, the “test” antigen showed similar or higher values compared with the “known” antigen in all different dilutions. Figures 2a and 2b show the known values to the “known” antigen (MVV strain K1514) and the “test” MVV antigen.

## Discussion

This study shows that it is possible that the band protein belongs to the MVV, as well as that the CPE is characteristic of the infection by MVV in a fibroblast culture. It appears that CPE is compatible with MVV infection (Chippaux-Hyppolite *et al.*, 1972).

In the ultracentrifugation, the formation of a virus band was observed in the same height as also verified by Ellis *et al.* (1985) for *Lentivirus* of small ruminants.

Rafnar *et al* (1998) verified through the SDS-PAGE technique the formation of similar bands when compared to the bands of the “obtained virus”, and still, the formation in similar weight of a great band for the known protein pattern is really indicative of the presence of MVV. However, the

values of the bands found were not equal to the expected 135 kDa. It is believed that the action of SDS and the heat were responsible for breaking the envelope protein of the viral particle. Thus, the degradation of the gp135 originated the gp70.

In the electrophoresis without SDS the “test” viruses proteins formed similar bands in the policrilamida gel, similar to the standard protein gp135. This protein was considered as responsible for the precipitation line in the AGID test, however being a portion of the standard protein gp135.

It was not determined in ELISA the cutoff or the viral titulation, because the virus quantity was minimum. It is necessary, though, to verify the presence of a possible immunological response when using the “test” virus when compared to the standard virus.

In ELISA, the largest values obtained in the various dilutions of the “test” antigen can be related to a better adaptation – possibly due to the different dilutions of the standard serum. It is necessary to obtain afterwards the viral title and also verify the test’s specificity and sensibility in relation to the isolated virus in the northeast of Brazil.

The results showed that the “test” viral sample is less concentrated than the standard K1514 viral sample. Therefore, it was evidenced the existence of the Maedi/Visna virus in the northeast of Brazil, even in ovine native flocks.

### **Acknowledgments**

We are indebted to Dr. José Albérico Araújo Lima, for the technical support in the ultracentrifugation process. Members of the Laboratory of Human Biochemistry of Ceará State University, for the technical support in SDS-PAGE process. We also thank Dr. Roberto Soares de Castro for the kindness of providing the sample of the MVV strain K1514. Ceará’s Research Support Foundation (FUNCAP) supported this work.

## References

1. ADAMS, D.O. Cell Culture. *In*: Jakoby, W.B. and Pastan, I.H editors. 1979. Methods in Enzimology, **58 ed**, New York: Academic Press Inc., p.494-506.
2. BRODIE, S.J.; LA CONCHA BERMEJILLO, A.; SNOWDER, G.D. *et al.* 1998. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: a review. *Small Rum. Res.* **27**, 1 – 17.
3. CHIPPAUX-HYPPOLITE, C.; TARANGER, C.; TAMALET, J. *et al.* 1972. Aspects Ultrastructuraux du virus visna en cultures cellulaires. *Ann. Inst. Pasteur* **123**, 409-420.
4. DE MARTINI, J.C.; BOWEN, R.A.; CARLSON, J.O. *et al.* 1991. Strategies for the genetic control of ovine lentiviral infections. *In*: R.F.E. (Ed.) Breeding for disease resistance in farm animals, Axford, p.293 - 314.
5. ELLIS, T.M.; WILCOX, G.E. and ROBINSON, W.F. 1985. Characteristics of cell fusion induced by a caprine retrovirus. *Archiv. Virol.* **86**, 263-273.
6. GENDELMAN, H.E., NARAYAN, O., MOLINEAUX, S. *et al.*, 1985. Slow persistent replication of lentiviruses: role of macrophages and macrophages precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 7086-7090.
7. GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P.G.E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J.E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. 1986. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.* **58**, 67-74.
8. HAASE, A.T.; STOWING, L.; NARAYAN, O.; GRIFFIN, D.E.; PRICE, D. 1977. Slow persistent infection caused by visna virus: role of host restriction. *Science* **195**, 175-177.
9. HAASE, A.T. 1986. Pathogenesis of lentivirus Infections, *Nature* **322**(10), 130-136.
10. KENNEDY, G.E.P., NARAYAN, O., GHOTBI, Z. *et al.* 1985. Persistent expression of a antigen and viral genome in maedi / visna virus-induced inflammatory cells. *J. Exp. Med.* **162**, 1970 – 1982.
11. LAIRMORE, M.D.; AKITA, G.Y.; RUSSELL, H.I.; DEMARTINI, J.C. 1987. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with *in vivo* pathogenicity. *J. Virol.* **61**, 4038-4042.

12. MACINTYRE, E.H.; WINTERSGILL, C.J.; VATTER, A.E. 1973. Visna virus infection of sheep and humans cells in vitro - an ultrastructural study. *J. Cell. Sci.* **13**, 173-191.
13. NARAYAN, O.; WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; GRIFFIN, D.E.; CORK, L.C. 1982. Slow virus-replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goat. *J. Gen. Virol.* **59**, 345-356.
14. NARAYAN, O., CORK, L.C. 1985. Lentiviral diseases of sheep and goats chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. *Vet. Infect. Dis.* **7**(89): 89-98.
15. NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* **70**, 1617 - 1639.
16. PHILIPPON, V.; VELLUTINI, C.; GAMBERELLI, D. *et al.* 1994. The basic domain of the lentiviral *Tat* protein is responsible for damages in mouse brain: involvement of cytokines. *Virology* **205**, 519 - 529.
17. RAFNAR, B.; TOBIN, G.J.; NAGASHIMA, K. *et al.* 1998. Immune response to recombinant visna virus Gag and Env precursor proteins synthesized in insect cells. *Virus Res.* **53**, 107-120.
18. THORMAR, H. 1961. An electron microscope study of tissues cultures infected with visna virus. *Virology* **14**, 463-475.

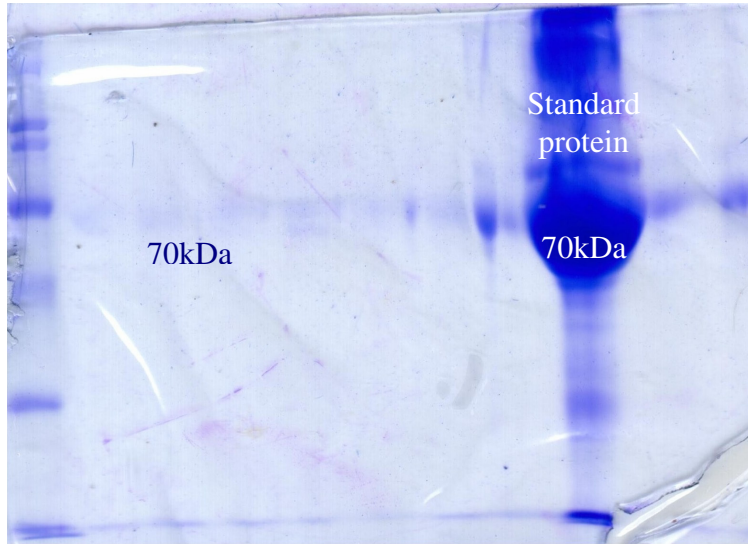


Figure 1. SDS-PAGE of the protein MVV test and standard protein stained with Coomassie brilliant blue

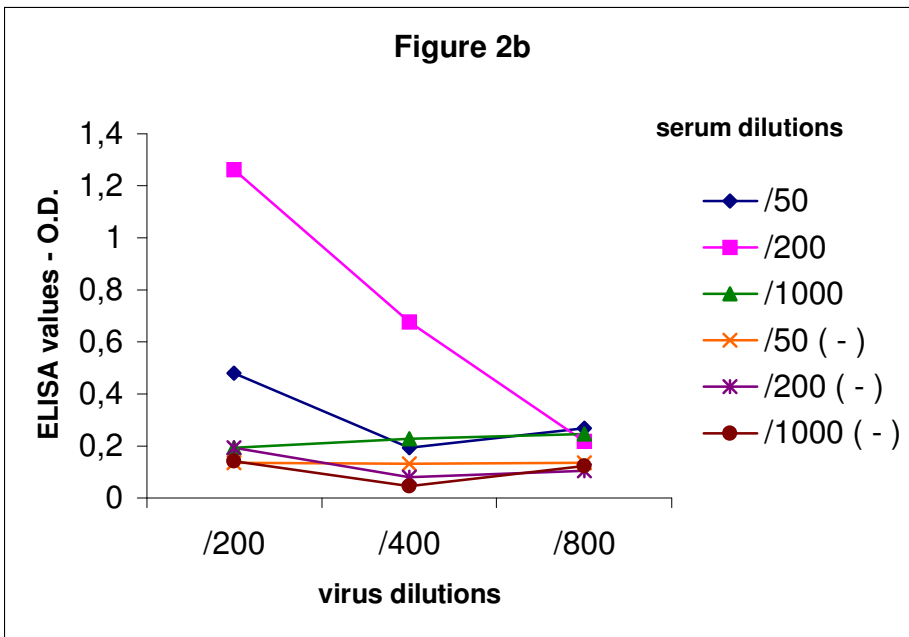
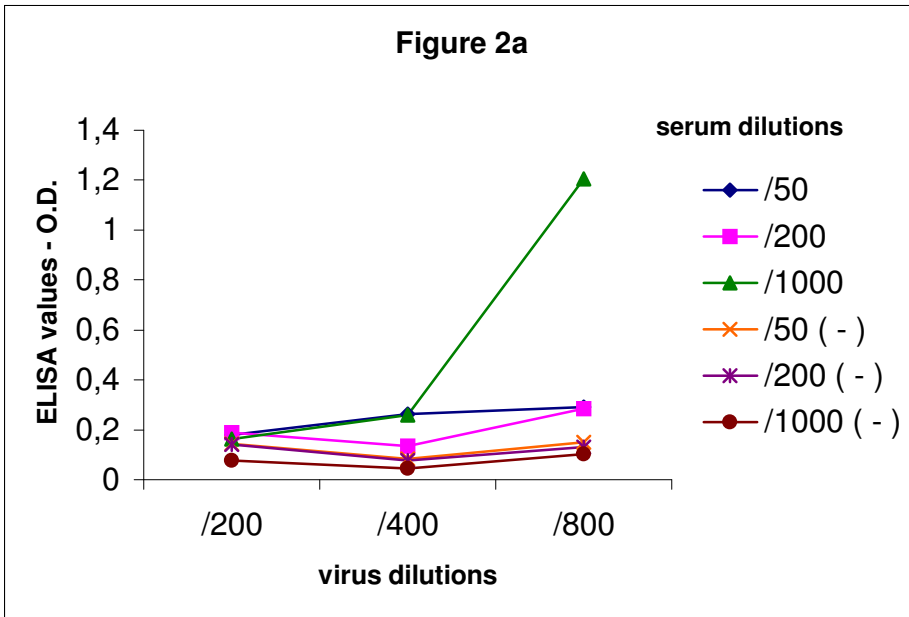


Fig 2. a) Values of the test of ELISA for the MVV strain K1514  
 b) Values of the test of ELISA for the MVV strain "test"

## **CONCLUSÃO GERAL**

O presente trabalho relata a real existência da lentivirose de pequenos ruminantes em nossa região, tendo este lentivírus características semelhantes ao Maedi/Visna Vírus, indicando que nossa ovinocultura pode estar comprometida com esta enfermidade, já comprovada sorologicamente, onde provavelmente esse vírus já contamina nossos animais desde o início das importações para melhoria genética do rebanho.

## PERSPECTIVA

Desta forma, uma vez concluída esta etapa, faz-se necessário a realização de experimentos que irão ainda mais caracterizar o vírus quanto a filogenética, indicando se é ou não uma cepa viral desconhecida, além de sua semelhança com os padrões, mostrando assim se já é uma cepa adaptada ao nosso clima e rebanho. Assim, estes experimentos serão extremamente úteis para melhor compreensão da variação genética adaptativa dos vírus do gênero *Lentivirus*, provocando estes conhecimentos a possibilidade da adoção de programas de controle mais eficazes em nossa região, aumentando com isto a produção animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Publicações SBF, Brasília/Fortaleza, 1ªed., 2001, 186p.

ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. *apud* CLARK & BAR-JOSEPH. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Publicações SBF, Brasília/Fortaleza, 1ªed., 2001, 186p.

ALMEIDA, A.M.R.; LIMA, J.A.A. *apud* VAN REGENMORTEL. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. Publicações SBF, Brasília/Fortaleza, 1ªed., 2001, 186p.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D. *et al.* Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissue of infected goats. **J. Virol. Methods**, v.50, p. 101-114, 1994.

BARTH, O.M. Contrastação Negativa. *In*: Souza, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. 2ª.ed, Rio de Janeiro, Soc. Bras. Microscopia, 1998, 179p. p.45-56.

BIEL, S.S.; MADELEY, D. Diagnostic virology – the need for electron microscopy: a discussion paper. **J. Clin. Virol.**, v.22, p.1-9, 2001.

BRENNER, S.; HORNE, R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Bioch. Biophys. Acta**, v.34, p.103, 1959.

BRODIE, S.J.; PEARSON, L.D.; SNOWDER, G.D. *et al.* Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus infected sheep. **Arch. Virol.**, v. 130, p. 413 - 428, 1993.

BRODIE, S.J.; LA CONCHA BERMEJILLO, A.; SNOWDER, G.D. *et al.* Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: a review. **Small Rumin. Res.**, v. 27, p. 1 - 17, 1998.

BULGIN, M.S. Ovine progressive pneumonia, caprine arthritis-encephalitis, and related lentiviral diseases of sheep and goats. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.6, p. 691-704, 1990.

CHAMBERS, T.J. Multinucleate giant cells. **J. Pathol.**, v. 126, p.125-148, 1978.

CLEMENTS, J.E., GDOVIN, S.L., MONTELARO, R.C., NARAYAN, O. Antigenic variation in lentiviral diseases. **Ann. Rev. Immunol.**, v.6, p. 139-159, 1988.

COLARICCIO, A.; SCHROEDER, A. **Curso teórico-prático: fundamentos e métodos em virologia vegetal.** Instituto Biológico – UFSC 1998, 36p.

CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; CHEEVERS, W. Chronic Arthritis in Goats Caused by a Retrovirus, **Science**, v.207, p.997-999, 1980.

CUTLIP, R.C.; JACKSON, T.A.; LAIRD, G.A. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. **Am. J. Vet. Res.**, v. 38, p. 1081-1084, 1977.

CUTLIP, R.C.; HOUWARD, D.; LEHMKUHL, H.D. *et al.* Ovine progressive pneumonia maedi-visna in sheep. **Vet. Microb.**, v.17, p. 237-250, 1988.

DAL PIZZOL, M., RAVAZOLLO, A., GONÇALVES, I.P.D. *et al.* Maedi-Visna: evidência de ovinos infectados no Rio Grande do Sul, Brasil, 1987-1989. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, v. 17, p. 65-76, 1989.

DANIEL, M.D.; KING, N.W.; LETVIN, N.L. *et al.* A new type D retrovirus isolated from macaques with an immunodeficiency syndrome. **Science**, v. 223, p. 602-605, 1984.

DE LA CONCHA BERMEJILLO, A.; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, S.J. *et al.* Veneral sheeving for ovine lentivirus in the semen of infected rams. **Am. J. Vet. Res.**, v.57, p. 684-688, 1996.

DE LA CONCHA BERMEJILLO, A. Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. **Food Animal Retroviruses**, v. 13, p.13-33, 1997.

DE MARTINI, J.C.; BOWEN, R.A.; CARLSON, J.O. *et al.* Strategies for the genetic control of ovine lentiviral infections. *In*: R.F.E. (Ed.) **Breeding for disease in resistance in farm animals**, Axford, 1991, p. 293 - 314.

DUBOIS - DALEC, M.; REESE, T.S.; NARAYAN, O. Membrane changes associated with assembly of visna virus. **Virology**, v.74, p.520 - 530, 1976.

EISBERG, R.; RESNICK, R. **Quantum physics of atoms, molecules, solids, nuclei and particles**. 1a. ed, New York: John Wiley and Sons Press, 1974, 978p.

FIGUEIREDO, E.A.P., OLIVEIRA, E.R., BILLAVER, C., SIMPLICIO, A.A. **Performance dos ovinos deslanados no Nordeste do Brasil**. Sobral. EMBRAPA-CNPC, 1980 (EMBRAPA-CNPC, Comunicado Técnico, 1)

GENDELMAN, H.E., NARAYAN, O., MOLINEAUX, S. *et al.* Slow persistent replication of lentiviruses: role of macrophages and macrophages precursors in bone marrow. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.82: p. 7086-7090, 1985.

GENDELMAN, H.E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P.G.E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J.E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. **J. Virol.**, v. 58, p. 67-74, 1986.

GONDA, M.A.; BRAUN, M.J.; CARTER, S.G. *et al.* Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. **Nature**. v. 330, p.388-395, 1987.

GONZALEZ-SANTANDER, R. **Técnicas de microscopia eletrônica em biologia**, 1<sup>a</sup>.ed, Madrid, Aguilar editora, 1969, 665p.

HAASE, A.T.; STOWING, L.; NARAYAN, O.; GRIFFIN, D.E.; PRICE, D. Slow persistent infection caused by visna virus: role of host restriction. **Science**, v. 195, p. 175-177, 1977.

HAASE, A.T. Pathogenesis of lentivirus infections, **Nature**, v.322, n.10, 1986.

HARRIS, J.R. The ultrastructure of multinucleate giant cells. **Micron**, v.24(2), p. 173-231, 1993.

HEIDCAMP, W.H. **Cell Biology Laboratory Manual**, 1<sup>st</sup>. ed., Gustavus Adolphus College, St. Peter, 1996. 231p.

IBGE/MINISTÉRIO DA AGRICULTURA **Censo Agrícola Brasileiro**, 1997.

KENNEDY, G.E.P., NARAYAN, O., GHOTBI, Z. *et al.* Persistent expression of a antigen and viral genome in maedi / visna virus-induced inflammatory cells. **J. Exp. Med.**, v. 162, p. 1970 - 1982, 1985.

KNOWLES, D.P.; EVERMAN, J.P.; SHOPSHIRE, C. *et al.* Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **J. Clin. Microb.**, v.32, p.243-245, 1994.

KURSTAK, E. Progress in enzyme immunoassays: production of reagents, experimental design, and interpretation. **Bull. of the WHO**, v.63, p. 793-811, 1985.

KWANG, J.; ROSATTI, S.; YANG, S. *et al.* Recognition of ovine lentivirus *gag* gene products by serum from infected sheep. **Vet. Immunol. Immunop.**, v. 55, p. 107- 114, 1996.

LAIRMORE, MD., BIUTERA, S.T, CALLAHAN, G.N., DEMARTINI, J.C., Spontaneous interferon production by pulmonary leukosis is associated with lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. **J. Immunol.**, v. 140, p. 779-785, 1988.

MARCOM, K.A., BRODIE, S.J., PEARSON, L.D. *et al.* Analysis of ovine lentivirus infectivity and replication using a focal immunoassay and an antigen-capture ELISA. **J. Clin. Microb.**, v. 30, p.2852-2858, 1992.

MARSH, H. Progressive pneumonia in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 62, p.458-473, 1923.

MITCHELL, D.T. Investigations into jaagziekte or chronic catarrhal pneumonia in sheep. **Dir. Vet. Educ. Res.**, 3rd. ed., 4th report, Union of South Africa, 585p, 1915.

NARAYAN, O.; WOLINSKY, J.S.; CLEMENTS, J.E.; STRANDBERG, J.D.; GRIFFIN, D.E.; CORK, L.C. Slow virus-replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goat. **J. Gen. Virol.**, v. 59, p. 345-356, 1982.

NARAYAN, O., CORK, L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Vet. Infect. Dis.**, v. 7, n.89, 1985.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **J. Gen. Virol.**, v. 70, p. 1617 - 1639, 1989.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger – Principles of Biochemistry**, 3rd ed., Worth Publishers, New York, 2000, 1152p.

PAYMENT, P.; ASSAF, R.; TRUDEL, M.*et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for serology of infectious Bovine Rhinotracheitis Virus infections. **J. Clin. Microb.**, v.10, p. 633-636, 1979.

PAWLISCH, R.A.; MAES, R.K. Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. **Am. J. Vet. Res.**, v.45, p. 1808-1811, 1984.

PETURSSON, G.; ANDRESDOTTIR, V.; ANDRESSON, O.S. *et al.* Lentivirus diseases of sheep and goats: Maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis. *In*: Speedy AW (ed): Progress in Sheep and Goat Research. Walingford, UK, CAB International, p.107-129, 1992.

PHILIPPON, V.; VELLUTINI, C.; GAMBERELLI, D. *et al.* The basic domain of the lentiviral *Tat* protein is responsible for damages in mouse brain: involvement of cytokines. **Virology**, v. 205, p. 519 - 529, 1994.

PHILIPS, D.M. Insect sperm: their structure and morphogenesis. **J. Cell Biol.**, v.44, p.243-277, 1970.

RHEE, S.; HUNTER, E. Myristylation is required for intracellular transport but not for assembly of D-type retrovirus capsids. **J. Virol.** v. 61, p. 1045 - 1053, 1987.

ROMERO, C.H. **Manual de técnicas virológicas e sorológicas para o isolamento e identificação de vírus suínos e seus anticorpos.** EMBRAPA - Suínos e Aves, 1989, 73p.

SHARER, L.R.; CHO, E.S.; EPSTEIN, L.G. Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. **Human Pathol.** v.16, p.760, 1985.

SIMARD, C.L.; BRISCOE, M.R. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. **Can. J. Vet. Res.**, v. 54, p. 1891-1896, 1990.

SOUSA, W.H. **Manejo de ovinos deslanados.** Informe Técnico. EMEPA, 1-6, 1992.

SNYDER, M.L.; ERICKSON, G.A. **Recommended minimum standards for an enzyme-linked serodiagnosis.** U.S.D.A., A.P.H.I.S, U.S. National Veterinary Services Laboratories, Ames, 32p. 1981.

TAKEYA, M.; NATIO, M.; ETO, K. *et al.* Immunohistochemical characterization of multinucleate giant cells in the brain of a Japanese AIDS patient. **Acta Pathol. Jpn.**, v. 41, p. 212-216, 1991.

VELLUTINI, C.; PHILIPPON, V.; GAMBERELLI, D. *et al.* The maedi/visna virus *Tat* protein induces multiorgan lymphoid hiperplasia in transgenic mice. **J. Virol.**, v. 64, p. 4955 - 4962, 1994.

WILLS, J.N.; CRAVEN, R.C. Form, function and use of retroviral *gag* proteins. **AIDS**, v. 5, p. 639 - 654, 1991.

**ANEXO**

## PROTOCOLO PARA PREPARO DA TÉCNICA DE SDS - PAGE

### Preparo da Acrilamida (Bis-30%):

Material necessário:

Acrilamida

Bis-Acrilamida

Água destilada e deionizada

Papel filtro

Procedimento:

15 gramas de Acrilamida + 0,4 gramas de bis-Acrilamida em 50mL de água destilada e deionizada

Filtrar em papel filtro

Armazenar a 4°C

Obs: Manter a solução em frasco protegido da luminosidade

Válido por 30 dias

### Main Gel - 12%:

Material necessário:

Água destilada e deionizada

Tris-HCl 1,5M pH 8,8

SDS 10%

Acrilamida (Bis-30%)

TEMED

Persulfato de Amônio 10%

**Tris-HCl 1,5M pH 8,8** - 3,6342 gramas de Tris-HCl em 20mL de água destilada e deionizada.

Procedimento para 10mL

3,31mL de água destilada e deionizada + 2,5mL de Tris-HCl + 100µL de SDS 10% + 4mL de Acrilamida (Bis-30%) + 8,5µL de TEMED + 85µL de Persulfato de Amônio 10% = 10mL de Main Gel.

### Stacking Gel - 4%;

Material necessário:

Água destilada e deionizada

Tris-HCl 1,0M pH 6,8

SDS 10%

Acrilamida (Bis-30%)

TEMED

Persulfato de Amônio 10%

**Tris-HCl 1,0M pH 6,8** - 2,4828 gramas de Tris-HCl em 20mL de água destilada e deionizada.

Procedimento para 5mL:

3,68mL de água destilada e deionizada + 0,63mL de Tris-HCl + 50µL de SDS 10% + 0,65mL de Acrilamida (Bis-30%) + 5µL de TEMED + 25µL de Persulfato de Amônio 10% = 5mL de Stacking Gel.

### **Tampão da Amostra**

Material necessário:

Água destilada e deionizada

Tris HCl 0,5M - pH 6,8

Glicerol

SDS 10%

2-β-mercaptoetanol

Azul de bromofenol 0,05%

Procedimento para 8mL:

4mL de água destilada e deionizada + 1mL de Tris HCl + 0,8mL de glicerol + 1,6mL de SDS + 0,2mL de azul de bromofenol = 8mL de tampão da amostra

Obs: Manter em temperatura ambiente

### **Tampão de Corrida**

Material necessário:

Tris HCl

Glicina

SDS

Água destilada e deionizada

Procedimento para 600mL:

9 gramas de Tris + 43,2 gramas de glicina + 3 gramas de SDS + 600mL de água destilada e deionizada = 600mL de tampão de corrida.

Obs: Estocar a 4°C

Aquecer a 37°C no momento de uso.

### **Solução Corante**

Material necessário:

Azul brilhante Coomassie R250 à 0,05%

Metanol 40%

Ácido acético 10%

Água destilada e deionizada

Procedimento para 1000mL:

0,67 gramas de azul de Coomassie 75%+ 400mL de metanol + 100mL de ácido acético + 500mL de água destilada e deionizada = 1000mL de Solução Corante

Obs: tempo de coloração de 15 à 30 minutos

### **Solução Descorante:**

Material necessário:

Ácido acético

Metanol

Água destilada e deionizada

Procedimento para 100mL:

7mL de ácido acético + 30mL de metanol + 63mL de água destilada e deionizada = 100mL de solução descorante.

Obs: tempo de descoloração: 1 a 3 horas

### **Solução Secante:**

Material necessário:

Glicerol

Metanol

Água destilada e deionizada

Procedimento para 200mL:

6mL de glicerol + 100mL de metanol + 94mL de água destilada e deionizada = 200mL de solução secante.

Obs: solução para secar o gel, deixar *overnight* à 4°C, depois lavar com água e secar ao ambiente.

## PROTOCOLO PARA FIXAÇÃO DA AMOSTRA VIRAL

### **Tampão Millonig (2x concentrado)**

Material necessário:

Fosfato monossódico – 1 – hidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) a 4,52%

Hidróxido de sódio (NaOH) a 5,12%

Água destilada

Sacarose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ )

Procedimento para 110mL

A 83mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (4,52%) juntar 1,08g de  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$  acrescentar 17mL passo a passo de NaOH até ajustar o pH em 7,3, não ultrapassando este valor. Se o ajuste ocorrer antes que complete os 17mL de NaOH (5,12%), completar a diferença para 100mL com água destilada e filtrada, e só assim adicionar 10mL de água destilada e filtrada.

### **Fixador S (standard) a 2%**

Material necessário:

Gluteraldeído + Tampão Millonig (2x concentrado)

Gluteraldeído ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) 25%

Tampão Millonig (2x concentrado)

Água destilada e filtrada

Procedimento para 10mL:

1,2mL de  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  (25%) + 5,0mL de Tampão Millonig (2x concentrado) + 3,8mL de água destilada e filtrada.

Para a amostra ser fixada, a proporção entre as suspensões deverá ser de duas partes de Fixador S para uma parte de suspensão.

Inicialmente, o material fixado deverá ficar por uma hora em temperatura ambiente, colocando-o logo após em refrigerador.

## CONTRASTAÇÃO NEGATIVA E REVELAÇÃO DE MICROFOTOGRAFIAS

Contrastação negativa:

Material necessário:

Acetato de uranila ( $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

Água destilada e filtrada

Procedimento para 100mL:

2g de  $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  + completar com água destilada e filtrada até 100mL.

Revelação de negativos:

Material necessário:

Revelador D19

Água destilada

Fixador F5

Revelador D19

Água ( $\pm 40^\circ\text{C}$ ) tridestilada – 1000mL

Metol ( $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ ) – 5g

Sulfito de sódio anidro ( $\text{NaSO}_2$ ) – 225g

Hidroquinona ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) – 20g

Carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) – 132g

Brometo de potássio (KBr) – 12,5g

Completar com água tridestilada até 2500mL

Usar a proporção de dois de água para um de revelador.

Fixador F5

Água destilada ( $50^\circ\text{C}$ ) – 600mL

Hipossulfito de sódio – 240g

Sulfito de sódio – 15g

Ácido acético glacial – 13,44mL

Ácido bórico cristalizado – 7,5g

Alúmen de potássio – 15g

Completar com água destilada até 1000mL

Revelação de microfotografias propriamente dita:

Material necessário:

Revelador Dectol

Água destilada

Fixador F5

Revelador Dectol

Água ( $\pm 40^{\circ}\text{C}$ ) tridestilada – 600mL

Sulfito de sódio anidro ( $\text{NaSO}_2$ ) – 45g

Hidroquinona ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ ) – 12g

Carbonato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) – 80g

Brometo de potássio (KBr) – 2g

Adicionar as substâncias em constante agitação, completar a solução com água tridestilada para 1000mL, deixar em temperatura ambiente por 24 horas.

Usar a proporção de dois de água para um de revelador.