

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Suzana Aparecida Costa de Araújo**

**Estudo histológico de pulmões de ovinos  
sorologicamente positivos para Maedi-Visna.**

Fortaleza – Ceará

2004

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Suzana Aparecida Costa de Araújo**

**Estudo histológico de pulmões de ovinos  
sorologicamente positivos para Maedi-Visna.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

**Orientadora:** Maria Fátima da Silva Teixeira

Fortaleza – Ceará

2004

**Universidade Estadual do Ceará**  
**Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias**

**Título do Trabalho:** Estudo histológico de pulmões de ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna.

Autora: Suzana Aparecida Costa de Araújo

Defesa em: 13/12/2004

Conceito obtido: Satisfatório

**Banca Examinadora**

---

Maria Fátima da Silva Teixeira, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.

Orientadora

---

Franklin Riet-Correa, Prof. Dr.  
Co-orientador

---

Benito Soto Blanco, Prof. Dr.  
Examinador

---

Francisco Marlon Carneiro Feijó, Prof. Dr.  
Examinador

“Nada põe mais duramente à prova o espírito do dever do que a necessidade de contrariar aqueles, a quem nos sentimos ligados pela afinidade das idéias, pela harmonia das aspirações, pela comunhão da responsabilidade”.

Rui Barbosa

A Deus, primeiramente. Aos meus familiares e a meu noivo Eudmar, que torceram e colaboraram para a obtenção desta vitória, amo vocês.

Dedico.

## **Agradecimentos**

A DEUS, pela minha vida.

A minha mãe Alexandrina Madalena da Silva pelo incentivo, dedicação, paciência, compreensão, ajuda e carinho que me presta dia a dia;

A meu noivo, grande amor e amigo Eudmar Marcolino de Assis, pelo apoio, carinho, compreensão e incentivo tanto nos momentos de alegria quanto nos momentos árdusos;

À minha família e em especial, a Felismina (avó), João Vicente (avô), Fátima Russo (tia), Gláucia e Silvia (irmãs) por fazerem parte da minha vida;

À Profa. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira, que além de orientadora foi uma grande amiga. Minha grande admiração, não apenas pelo profissional, mas pelo ser humano que tive o privilégio de conviver durante este período;

Ao Prof. Dr. Franklin Riet-Corrêa, pela contribuição, orientação e incentivo;

Ao Prof. Dr. Benito Soto Blanco pela colaboração e valiosas sugestões;

Ao Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó, pelos ensinamentos, amizade, e por ter me iniciado no mundo da Pesquisa.

À minha grande amiga Tânia Valeska Medeiros Dantas pela convivência, aprendizado que com certeza muitas saudades deixarão;

A Keillak, Kethleen, Diego e Tânia, minha segunda família, pelo acolhimento, apoio e acima de tudo amizade;

A Micheline do Vale Maciel pela amizade e momentos de alegria proporcionados;

Aos amigos do Laboratório de Virologia: Tânia Valeska Medeiros Dantas, Adriana Lopes Ribeiro, Ana Cristina, Jean Berg Alves da Silva, Ney de Carvalho Almeida, Aracely Rafaelle Fernandes Ricarte, pela colaboração, amizade e convívio;

A todos os meus colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração e amizade;

A UECE, por ter disponibilizado as condições técnicas e pessoal;

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela amizade, incentivo, convívio e opiniões compartilhadas;

Á CAPES pelo apoio financeiro concedido sob forma de bolsa que foi de suma importância para a execução do trabalho;

Ao Abatedouro Marupiara pela acolhida e colaboração na realização deste trabalho;

A todos aqueles que mesmo a distância, direto ou indiretamente, torceram por esta grande vitória.

As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem.

## **Resumo**

Maedi-Visna é uma doença crônica e progressiva de ovinos. O agente etiológico Maedi-Visna Vírus (MVV) é um lentivírus pertencente à família Retroviridae. As maiores manifestações da inflamação induzida pelo MVV são perda progressiva de peso, pneumonia intersticial, encefalomielite, mastite, artrite e linfadenopatia. Com o objetivo de identificar anticorpos e lesões pulmonares sugestivas da Maedi-Visna foram coletadas amostras de sangue e fragmentos pulmonares de 223 ovinos provenientes de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza, Ceará, Brasil. Os soros foram submetidos ao teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) utilizando-se um kit diagnóstico para Maedi-Visna fornecido pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Constatou-se que 11 amostras (5%) dos animais amostrados apresentavam-se positivos para o teste de IDGA. Os fragmentos pulmonares dos animais soropositivos e igual número de animais soronegativos foram estudados histologicamente. Não foram encontradas lesões macroscópicas e histológicas características de Maedi-Visna tanto nos animais soropositivos quanto nos soronegativos. Esses resultados confirmam a ocorrência de infecções subclínicas por MVV, sem lesões macroscópicas ou histológicas, e evidenciam a necessidade de um diagnóstico sistemático das afecções respiratórias, da glândula mamária, das articulações e do sistema nervoso central de ovinos para determinar a importância de Maedi-Visna para a ovinocultura em diferentes regiões do País .

**Palavras-chave:** Lentivírus, Maedi-Visna, histopatologia, infecções subclínicas.

## **Abstract**

Maedi-Visna (MV) is a chronic and progressive disease of sheep. The etiologic agent- Maedi-Visna Virus (MVV) is a lentivirus belonging to the Retroviridae family. The main manifestations of MV are progressive weight loss, interstitial pneumonia, encephalomyelitis, mastitis, arthritis and lymphadenopathy. With the objective of identify lung lesions on sheep with antibodies against MVV samples of blood and lung fragments of 223 coming sheep were collected in slaughterhouses of the metropolitan area of Fortaleza, State of Ceará, Brazil. The serum samples were submitted to the agar-gel immunodiffusion test (AGIDT) using a kit diagnosis for MV supplied by the Federal Rural University of Pernambuco. Eleven (5%) of the serum samples were positive for antibodies to MVV. The lung samples of the positive sheep and 11 lung samples from the negative sheep were studied histologically. No lesions characteristic of MV were observed macroscopically or histologically in sheep with and without antibodies. These results confirmed the occurrence of subclinical MVV infections without gross or histological lesions. The systematic diagnosis of diseases of the respiratory and central nervous systems, joints and mammary gland in sheep should contribute the knowledge of the importance of MV for sheep in the different Brazilian regions.

**Key words:** Lentiviruses, histopathology, Maedi-Visna, subclinical infections.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| Lista de Abreviaturas e/ou Símbolos.....                        | 12 |
| Lista de Figuras.....   | 14 |
| 1. Introdução.....  | 15 |
| 2. Revisão de Literatura .....                                  | 17 |
| 2.1. Ovinocultura Nordestina.....                               | 17 |
| 2.1.1. Histórico e Importância.....                             | 17 |
| 2.2. Maedi-Visna .....  | 18 |
| 2.2.1. Histórico.....   | 18 |
| 2.2.2. Etiologia .....  | 19 |
| 2.2.3. Replicação viral.....                                    | 21 |
| 2.2.4. Patogenia.....   | 22 |
| 2.2.5. Antigenicidade.....                                      | 25 |
| 2.2.6. Resposta Imunológica.....                                | 25 |
| 2.2.7. Sintomatologia.....                                      | 28 |
| 2.2.8. Alterações patológicas .....                             | 29 |
| 2.2.9. Diagnóstico.....   | 30 |
| 2.2.9.1. Imunodifusão em gel de agarose (IDGA).....             | 31 |
| 2.2.9.2. Histopatologia.....                                    | 32 |
| 2.2.9.3. Imunohistoquímica.....                                 | 33 |
| 2.2.9.4. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) ..... | 33 |
| 2.2.9.5. Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) .....     | 34 |
| 2.2.9.6. Isolamento em Cultivo Celular.....                     | 35 |
| 2.2.9.7. Microscopia Eletrônica .....                           | 36 |
| 2.2.9.8. Hibridização <i>in situ</i> (HIS) .....                | 36 |
| 2.2.9.9. Dot-Blot ou Dot-imunoblotting .....                    | 37 |
| 2.2.9.10. Western blotting ou Imunoblotting.....                | 37 |
| 2.2.9.11. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....             | 38 |
| 2.2.10. Transmissão.....  | 38 |
| 2.2.11. Controle e profilaxia.....                              | 39 |
| 3. Justificativa .....  | 40 |

|    |   |    |
|----|---|----|
| 4. | Hipótese científica.....                                    | 41 |
| 5. | Objetivos.....  | 42 |
|    | 5.1. Objetivo Geral.....                                    | 42 |
|    | 5.2. Objetivos Específicos.....                             | 42 |
| 6. | Material e Métodos.....                                     | 43 |
|    | 6.1. Amostras.....  | 43 |
|    | 6.2. Técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) ..... | 43 |
|    | 6.3. Histopatologia.....                                    | 44 |
|    | 6.4. Análise Estatística .....                              | 44 |
| 7. | Resultados e Discussão.....                                 | 45 |
| 8. | Conclusões .....  | 48 |
|    | Referências Bibliográficas .....                            | 49 |
|    | Artigo .....  | 65 |

## **Lista de Abreviaturas e/ou Símbolos**

% - Percentagem

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

AIEV – Vírus da Anemia Infecciosa Equina

BIV - Vírus da Imunodeficiência Bovina

CA - Capsídeo

CAEV – Vírus da Artrite Encefalite Caprina

cm – Centímetro

DAB – 3,3'-Diaminobenzidine

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ECP – Efeito Citopático

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

*env* – Gene que codifica as proteínas do envelope viral

FC – Fixação de complemento

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

*gag* - Gene que codifica as proteínas internas do vírus

gp – Glicoproteína

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HIS – Hibridização *in situ*

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

IDGA - Imunodifusão em Gel de Agarose

IgG – Imunoglobulina G

JDV - Vírus da Doença de Membrana

KDa - Kilodaltons

LTR – Sequências longas repetidas

LVOv – Lentivirose ovina

LVPR – Lentivírus de Pequenos Ruminantes

MA - Matriz

ME – Microscopia Eletrônica

Mg<sup>2+</sup> - Íon Magnésio

MHC - Complexo de Histocompatibilidade Principal  
mm – Milímetro  
mM – Mili-molar  
MSC – Membrana Sinovial Caprina  
MV - Maedi-Visna  
MVV - Maedi-Visna Vírus  
NC – Nucleocapsídeo  
 $\eta\text{m}$  – Nanômetro  
 $^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius  
OIE – Organização Internacional de Epizootias  
PBS – Solução tampão de fosfato  
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase  
pH – Potencial de hidrogênio  
*pol* - Gene que codifica as enzimas virais  
*rev* - Gene de regulação viral  
RIFI - Reação de Imunofluorescência indireta  
RNA – Ácido Ribonucléico  
SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia  
SRD – Sem Raça Definida  
SU – Glicoproteína de superfície  
*tat* - Gene de regulação viral  
TM – Glicoproteína transmembrânica  
TR - Transcriptase reversa  
UECE – Universidade Estadual do Ceará  
UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
*vif* - Gene de regulação viral  
 $\mu\text{l}$  - Microlitro

## **Lista de Figuras**

|  |    |
|--|----|
| Figura 01 – Estrutura do Maedi-Visna Vírus (Coffin, 1996).....                           | 19 |
| Figura 02 – Representação esquemática da estrutura do provírus do Maedi-Visna Vírus..... | 21 |

## 1. Introdução

A criação de ovinos tem sido vista como uma atividade empreendedora, geradora de empregos e renda e fixadora do homem no campo. Apesar de toda esta importância, a maioria das criações de ovinos no sertão nordestino ainda é feita de forma extensiva e rudimentar, sem controle sanitário, nutricional e/ou reprodutivo dos rebanhos, levando a uma baixa produtividade e caracterizando-se, desta forma, como um entrave para o crescimento desta atividade.

As enfermidades infecto-contagiosas são uma das maiores responsáveis por esta produtividade deficitária, dentre estas pode-se destacar a lentivirose provocada pelo Maedi-Visna Vírus (MVV). Maedi-Visna (MV) é uma doença debilitante de ovinos adultos, multissistêmica e de evolução crônica (Oliver *et al.*, 1981). O animal acometido apresenta um definhamento progressivo com conseqüente queda na produtividade (Pritchett, 1994).

A alta variabilidade genômica do vírus tem contribuído para a origem de muitas cepas virais com diferentes patogenicidades (De la Concha-Bermejillo, 1997); por esta razão, as manifestações clínicas e patológicas da infecção pelo MVV em áreas geográficas diferentes podem ser variáveis.

De acordo com Sigurdsson *et al.*, (1960) este lentivírus foi isolado pela primeira vez em rebanhos islandeses. No Brasil a presença de ovinos sorologicamente reagentes ao MVV foi registrada primeiramente por Moojen *et al.*, (1986). Durante muitos anos o semi-árido nordestino foi considerado livre desta enfermidade, talvez pela inexistência de dados que confirmassem a sua ocorrência. No entanto, nos últimos anos algumas pesquisas vieram confirmar a sua ocorrência em alguns estados nordestinos como Pernambuco (Abreu *et al.*, 1998), Ceará (Almeida, 1999) e Rio Grande do Norte (Silva, 2003), onde a sorologia positiva de um número significativo de animais indicou que há necessidade de maiores estudos sobre a enfermidade nos rebanhos da região Nordeste, que se caracteriza por ter o maior rebanho ovino do Brasil (Vasconcelos & Vieira, 2003).

O diagnóstico da Maedi-Visna por testes sorológicos, como a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto está sujeito a resultados falso-negativos e falso-positivos, dada a grande flutuação de

anticorpos séricos (Blacklaws *et al.*, 1994). O exame histopatológico, apesar de sugerir a doença, não é conclusivo. Desta forma o presente trabalho teve como objetivo determinar a presença de lesões macroscópicas e histológicas característica de Maedi-Visna em ovinos sorologicamente positivos para Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR).

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. Ovinocultura Nordestina**

#### **2.1.1. Histórico e Importância**

A ovinocultura vem se constituindo nos últimos anos como uma atividade de alta rentabilidade, quando explorada de forma correta e sensata, o que não a caracteriza como uma das atividades responsáveis pela fixação do homem no meio rural servindo como fonte de proteína e renda. Ao longo dos anos, esta atividade foi desenvolvida de forma extensiva sem que fosse realizado qualquer tipo de controle sobre os animais, dificultando assim o diagnóstico dos problemas responsáveis pela baixa produção destes. Porém, com o início da produção em larga escala alguns destes problemas, que há muito aconteciam, mas não eram percebidos passaram a atuar como entrave ao crescimento desta atividade, dentre estes problemas, podemos destacar os de ordem sanitária, especialmente as doenças infecto-contagiosas que atuam diminuindo a produtividade e comprometendo a lucratividade da produção.

À medida que os sertões foram sendo desbravados em decorrência da expansão das fronteiras agrícolas, os rebanhos ovinos foram sendo confinados em determinadas áreas do Nordeste, onde, sendo submetidos à ação da seleção natural, formaram grupos étnicos bem diferenciados e que foram adaptando-se às condições adversas do semi-árido nordestino, os quais constitui o nosso rebanho ovino atualmente (Santana, 2003).

As secas periódicas comuns do Nordeste, que ocasionam escassez de pastagem, associadas com o sistema extensivo de criação, provocaram novos ajustamentos na relação animal/meio ambiente. Os grupos étnicos originais sofreram, ao longo do tempo, redução no seu porte e características produtivas (Santana, 2003).

A ovinocultura deslanada explorada, essencialmente, para carne poderá constituir-se em fonte de renda, amenizando a fome protéica que assola grande parte do Brasil. Os cruzamentos industriais de ovelhas deslanadas do Nordeste com machos de raças exóticas, aliados a outras tecnologias, tais como manejo, nutrição, sanidade e reprodução, certamente possibilitarão maior produtividade numérica e ponderal dos rebanhos (Nunes *et al.*, 1997).

A criação de caprinos e ovinos, na Região, é uma atividade básica e generalizada que permeia a grande maioria das propriedades rurais, revestindo-se de grande

importância sócio-econômica para o homem do campo. Sendo responsável pelo fornecimento de 40% de toda proteína animal consumida pela população rural (Alves, 2003).

## **2.2. Maedi-Visna**

### **2.2.1. Histórico**

MV foi o primeiro membro de lentivírus reconhecido como uma doença independente de ovino. E foi também o primeiro membro de uma nova categoria de doenças, uma infecção com replicação lenta (Straub, 2004). Ao estudar o vírus Maedi-Visna, Sigurdsson (1954) criou o termo “vírus lento” ou lentivírus para aquelas infecções causadas por retrovírus que desenvolvem infecções crônicas de evolução lenta, persistente, progressiva e degenerativa.

As primeiras descrições de doenças com sintomatologia semelhante à da MV foram feitas na África do Sul (Mitchel, 1915) e, posteriormente, nos Estados Unidos da América (Marsh, 1923). Inicialmente Maedi-Visna foi reconhecida como duas entidades distintas. Os dois nomes são de origem islandesa: Maedi, que significa dispnéia, caracterizada por pneumonia intersticial progressiva crônica e Visna, que significa “demência” e caracteriza-se por leucoencefalomielite (Dawson, 1980). Quando as primeiras amostras de vírus foram isoladas de ovinos afetados com Visna (Sigurdsson *et al.*, 1960) e Maedi (Sigurdardóttir & Thormar, 1964), foi observada similaridade entre esses vírus. Estudos comparativos revelaram que tanto Maedi quanto Visna eram doenças causadas pelo mesmo vírus, originando assim a denominação Maedi-Visna (Thormar, 1965; Thormar & Helgadottir, 1965). Esta doença foi observada, mais tarde, em outras regiões do mundo, sendo a síndrome respiratória de maior prevalência. Vários nomes foram dados a esta enfermidade, tais como: ZWOERGERZIEKTE, na Holanda (De Boer, 1975; Houwers *et al.*, 1985), JAAGSIEKTE na África do Sul (Verwoerd *et al.*, 1983) e Doença Pulmonar de Montana ou Pneumonia Progressiva Ovina (PPO) nos Estados Unidos da América (Cutlip & Laird, 1976).

Além do MVV as Lentiviroses de Pequenos Ruminantes incluem o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), sendo sugerida a possibilidade de transmissão de LVPR

de caprinos para ovinos e vice-versa, como já foi demonstrado experimentalmente, podendo ocorrer à recombinação entre amostras ovinas e caprinas cujas conseqüências são desconhecidas (Callado *et al.*, 2001).

No Brasil, a primeira descrição de lentivírus de pequenos ruminantes foi feita no Rio Grande do Sul, com identificação de caprinos (Moojen *et al.*, 1986) e ovinos (Ravazzolo *et al.*, 1995; Sotomaior & Milczewski, 1997) soropositivos. A presença do vírus foi confirmada pelo posterior isolamento do vírus de caprinos (Hötzel *et al.*, 1993, Castro *et al.*, 1999) e ovinos (Milczewski *et al.*, 1997; Almeida, 2003).

### 2.2.2. Etiologia

O Maedi-Visna Vírus (MVV) é um RNA-vírus de fita simples, não oncogênico pertencente à família Retroviridae e ao gênero *Lentivírus*, que inclui além do MVV, o vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), os vírus das imunodeficiências em felinos (FIV), bovinos (BIV), símios (SIV) e humanos (HIV), além do vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIEV) (Small *et al.*, 1989) e da Doença de Jembrana (JDV) (Burkala *et al.*, 1998).

O MVV, como os demais lentivírus, são partículas esféricas, envelopadas de 80 a 100 nm de diâmetro (Clements & Zink, 1996), núcleo cônico e denso no qual estão inseridas duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, uma molécula de transcriptase reversa dependente de  $Mg^{2+}$  e proteínas do nucleocapsídeo (Gonda *et al.*, 1986). O envelope está associado covalentemente com as glicoproteínas transmembranárias (TM) e de superfície (SU). Outra estrutura presente na partícula viral é a matriz, situada entre o capsídeo e o envelope (Pepin *et al.*, 1998). Estruturas estas demonstradas na Figura 01.

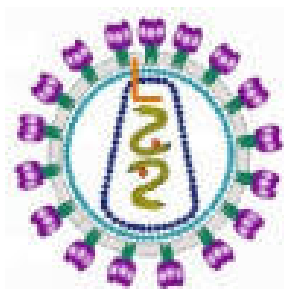


Figura 01 – Representação estrutural de um lentivírus (Coffin, 1996).

O DNA resultante (provírus), após a transcrição reversa mediada pela transcriptase do vírus, apresenta duas regiões terminais não codificantes (“*long terminal repeats*” ou “LTRs”). Entre estas duas regiões extremas estão os genes codificantes para proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), além dos genes acessórios *tat*, *vif* e *rev*, codificantes de proteínas reguladoras (Clements & Payne, 1994) (Figura 02). O gene *gag* codifica as proteínas internas não-glicosiladas com determinantes antigênicos específicos, da matriz (MA), do capsídeo (CA) e as nucleoproteínas (NU). A proteína MA é essencial na produção de vírions infectantes, a proteína CA é a mais abundante do vírus e elicit a produção de anticorpos durante a infecção e a proteína NC confere proteção ao RNA viral. O gene *pol* é o responsável por codificar proteínas de atividade enzimática: transcriptase reversa, protease, integrase e UTPase. O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope, SU e a TM (Quérat *et al.*, 1990). O gene acessório *tat* é essencial para a indução da patogenicidade e *rev* e *vif* participam da replicação viral (Harmache *et al.*, 1995; Clements & Zink, 1996; Joag *et al.*, 1996).

Os LVPR apresentam significativa variabilidade antigênica e genômica alterando as propriedades biológicas do vírion, assim como a persistência viral no hospedeiro, o tropismo celular, a taxa de replicação, a citopatogenicidade e o desenvolvimento da doença (Leroux *et al.*, 1995b). Estes lentivírus podem ser classificados de acordo com suas propriedades biológicas ou fenotípicas. Os LVPR podem ser divididos em dois grupos biologicamente distintos, designados tipo I ou grupo MVV e tipo II ou grupo CAEV (Quérat *et al.*, 1984; Zink & Johnson, 1994). O vírus protótipo do grupo I é o Visna, vírus islandês cepa K1514. Este tende a ser altamente citopático *in vitro*, causando lise em culturas primárias de células de membrana sinovial de caprinos (MSC) e de células do plexo coróide de ovinos (CPC), patogênico *in vivo* e sofre variação antigênica e induz a produção de anticorpos neutralizantes, enquanto o protótipo do grupo II é o CAEV cepa Cork que tende a produzir infecção persistente não lítica em cultura de células, exibindo baixa patogenicidade em animais infectados e induzindo a produção de anticorpos não neutralizantes (Pasick, 1998).

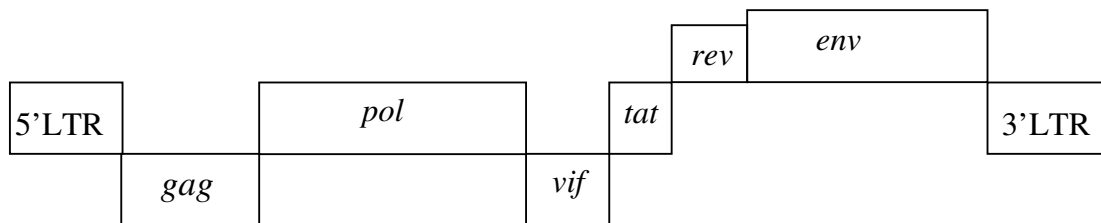


Figura 02 - Representação esquemática da estrutura do provírus do Maedi-Visna Vírus (MVV). LTR- *long terminal repeat*.

### 2.2.3. Replicação viral

O ciclo de replicação dos lentivírus inicia-se com o reconhecimento e ligação do vírus ao receptor celular e com fusão e penetração do nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira. Após a ligação específica da glicoproteína de superfície com o respectivo receptor, ocorre a fusão do envelope vírico com a membrana da célula (Gonda, 1994). Esta fusão é mediada por uma porção hidrofóbica da proteína transmembranar do envelope que penetra na membrana da célula, possibilitando a fusão (Oliveira, 1994). Em seguida à penetração, o vírion é desencapsulado, onde o RNA viral fica exposto pela remoção do capsídeo. Na sequência ocorre a retrotranscrição do RNA viral, pela ação da transcriptase reversa (TR), que promove a síntese do DNA proviral, este migra para o núcleo e sob ação da integrase é integrado ao núcleo celular. Poucas moléculas de DNA são integradas e este fato é importante para a persistência da infecção (Haase, 1986). O genoma viral então se torna parte do DNA celular e é duplicado durante a divisão celular. Como resultado, uma vez infectado, os animais permanecem infectados por toda a vida (De la Concha-Bermejillo, 1997). O DNA viral integrado pode permanecer latente até que fatores celulares ou virais o ativem (Fields *et al.*, 1996). No caso de expressão ativa do vírus, ocorre a transcrição com produção de RNAm(s) que serão codificados no citoplasma para a produção de proteínas reguladoras. O estágio final do ciclo envolve a reunião dos produtos dos genes estruturais, incorporação do RNA genômico às partículas víricas e aquisição do envelope viral, que em macrófagos é obtido pelo brotamento de vesículas citoplasmáticas, rompidas com o excesso de partículas virais, já nos

fibroblastos, o envelope é obtido pelo brotamento da membrana plasmática (Gonda, 1994).

O MVV infecta preferencialmente *in vivo* células das linhagens de monócitos e macrófagos (Narayan & Clements, 1989). *In vitro*, estes patógenos podem replicar-se em cultivos de células fetais do plexo coróide (Sigurdsson *et al.*, 1960), músculo liso cardíaco (Leroux *et al.*, 1995a), baço, timo, linfonodo escapular (Narayan *et al.*, 1980), membrana sinovial caprina (Crawford *et al.*, 1980), células de linhagens caprinas imortalizadas (Teixeira *et al.*, 1997) e tecido epitelial (Lee *et al.*, 1996). O efeito citopático produzido consiste na formação de células gigantes e multinucleadas e lise celular (Carey & Dalziel, 1983).

#### **2.2.4. Patogenia**

A replicação dos LVPR *in vivo* ocorre principalmente nas células do sistema monocítico-fagocitário, sendo os macrófagos a grande maioria das células infectadas (Luján *et al.*, 1994; Brodie *et al.*, 1995; De la Concha-Bermejillo, 1997). De acordo com Gendelman *et al.*, (1986), a infecção nas células depende da presença de receptores para o vírus. No entanto, poucos receptores estão presentes nos monócitos aumentando após sua maturação. Na verdade os receptores para entrada de LVPR dentro das células ainda não estão bem identificados. A capacidade dos LVPR para replicar em uma ampla cadeia de células sugere que ambos os vírus utilizem uma molécula comum como receptor ou use um número de diferentes receptores para entrar nas células. Dois estudos sugerem que a molécula MHC classe II tem sido o receptor para o MVV (Zink & Johnson, 1994).

Macrófagos infectados com MVV recrutam linfócitos agindo como apresentador de antígeno às células e posteriormente aos linfócitos T citotóxicos CD8+ (Lee *et al.*, 1994).

Sítios primários de infecção incluem o cérebro, nódulo linfático, baço e medula óssea. Replicação viral nestes sítios serve como um reservatório para o vírus infectar células precursoras (em medula óssea) assim como a localização primária de produção do vírus, presença de antígeno e a inibição da resposta imune para infecção viral. Apesar de um longo período para o desenvolvimento da doença, a replicação viral e a

resposta imune do hospedeiro ocorrem nas primeiras semanas após a infecção com o vírus (Narayan & Clements, 1989). A disseminação do vírus para os múltiplos órgãos envolvidos na doença ocorrerá pelos monócitos infectados que não expressam o vírus (Clements & Payne, 1994).

A replicação viral geralmente é limitada por determinados fatores, entre os quais cita-se a restrição viral mediada por interferon, produzido por linfócitos ativados durante sua interação com os macrófagos infectados. O interferon inibe a maturação de monócitos, com conseqüente da maturação viral (Zink *et al.*, 1987).

O RNA viral foi detectado também em células endoteliais, epiteliais, fibroblásticas, várias células do sistema nervoso (plexo coróide, células microgliais, astrócitos e neurônios) e da glândula mamária (Zink *et al.*, 1990; Brodie *et al.*, 1995; Sanna *et al.*, 1999; Mselli-Lakhal *et al.*, 1999; Lerondelle *et al.*, 1999; Capucchio *et al.*, 2003). Estudos utilizando isolamento viral, imunohistoquímica e hibridização *in situ* têm mostrado que os LVPR podem penetrar nestas células, entretanto a infecção produtiva é restrita às células da linhagem dos macrófagos (De la Concha-Bermejillo, 1997). *In vitro* os LVPR infectam e replicam em macrófagos (Narayan *et al.*, 1984), células fibroblásticas do plexo coróide e da membrana sinovial (Narayan *et al.*, 1980; Quérat *et al.*, 1984), células musculares lisas (Leroux *et al.*, 1995a) e glândula mamária (Mselli-Lakhal *et al.*, 1999; Lerondelle *et al.*, 1999) e fibroblastos imortalizados (Teixeira *et al.*, 1997).

Os LVPR são introduzidos no organismo dos animais susceptíveis geralmente por via digestiva ou respiratória (Huso *et al.*, 1988). Em seguida, o vírus infecta as células do sistema monocítico-fagocitário, produzindo a infecção persistente do hospedeiro. Os mecanismos desenvolvidos pelos lentivírus para persistência da infecção frente a resposta imune incluem: capacidade dos monócitos de conter provírus integrado em seu genoma sem ser detectado pelo sistema imune, pois a expressão do gene viral só é ativada quando os monócitos maturam para macrófagos (Brodie *et al.*, 1995); capacidade de infectar persistentemente macrófagos, sem causar lise celular, podendo disseminar o vírus no próprio hospedeiro, sem a produção de partículas virais, através do contato com outras células (Narayan *et al.*, 1985); interrupção do ciclo viral pelo processamento incompleto da SU (Chebloune *et al.*,

1996); replicação de variantes antigênicos na presença de anticorpos neutralizantes e produção de interferon, que diminui o índice de replicação e favorece a persistência do estímulo antigênico (Klevjer-Anderson & McGuire 1982; Narayan *et al.*, 1984; Zink *et al.*, 1987; Bertoni *et al.*, 1994; Cheevers *et al.*, 1993). A alta mutabilidade do agente que pode resultar em variantes antigênicas funciona como mecanismo de escape da resposta celular e humoral (Knowles *et al.*, 1990; Cheevers *et al.*, 1993; Lichtensteiger *et al.*, 1993).

Do local de infecção inicial pode ocorrer disseminação até os linfonodos regionais por meio das células dendríticas, que atuam tanto como carreadoras de vírus quanto como amplificadoras deste, uma vez que o mesmo é capaz de replicar-se nestas células (Ryan *et al.*, 2000).

MVV compartilha muitas características com o vírus da imunodeficiência humana, incluindo o estabelecimento de infecção persistente associada com linfoproliferação ativa crônica, na qual ovinos são afetados primeiramente nos pulmões, articulações, sistema nervoso central (SNC) e glândulas mamárias. Ao contrário das viroses imunodebilitantes, MVV não produz severa imunodeficiência (Ryan *et al.*, 2000).

Os lentivírus tem alta taxa de mutação, de 0,5 a 1 genoma por ciclo de replicação, que são acumulados e auxiliam a rápida evolução desse grupo de vírus (Castro, 1998). Coffin, (1996) e Preston & Dougherty (1996) relataram que estas mutações decorrem, geralmente, de erros nas polimerizações durante o ciclo de replicação lentiviral, com substituições de bases, arranjo genético, recombinação e hipermutações. A principal responsável por erros é a TR que, ao contrário das polimerases celulares, apresenta baixa fidelidade, devido a ausência da ação 3' – 5' exonuclease necessárias às correções de erros surgidos durante a polimerase celular, durante a replicação do DNA proviral, e da RNA polimerase celular II, quando da síntese de RNA a partir do DNA proviral (Preston & Dougherty, 1996).

### **2.2.5. Antigenicidade**

Em 1980, Narayan e colaboradores verificaram a relação antigênica entre a proteína p30 do MVV e um vírus responsável por leucoencefalomielite caprina. A respeito da reação cruzada, verificou-se que o vírus caprino era também antígenicamente distinto, uma vez que não foi neutralizado por uma amostra de soro ovino com altos títulos de anticorpos neutralizantes para o MVV. Os lentivírus CAEV e MVV manifestaram-se intimamente relacionados imunologicamente, pois um soro caprino infectado com CAEV precipitou proteínas e glicoproteínas dos dois vírus, apesar do perfil eletroforético dos vírus diferir significativamente, com exceção da proteína do capsídeo que apresentou peso molecular de 28 KDa para o CAEV e 27 KDa para o MVV (Dahlberg *et al.*, 1981).

### **2.2.6. Resposta Imunológica**

A infecção por MVV é caracterizada pela indução em intensidade variada de resposta imunológica celular e humoral, que não protegem contra a replicação viral (Cheevers *et al.*, 1993; Bertoni *et al.*, 1994). Estudos de seqüenciamento têm revelado que a resposta inicial é direcionada principalmente à proteína do capsídeo; por volta da quinta semana após a infecção são produzidos anticorpos para as proteínas do nucleocapsídeo, matriz, transmembranária e de superfície (De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1995). Os anticorpos neutralizantes para SU são produzidos tardiamente, em quantidade insuficiente, e são de baixa afinidade, de forma que não interrompem o ciclo de replicação viral (Narayan *et al.*, 1984; Kennedy-Stoskopf & Narayan, 1986; Cheevers *et al.*, 1993; Bertoni *et al.*, 1994).

A resposta celular é caracterizada pela proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Reyburn *et al.*, 1992) e T CD8<sup>+</sup> (Lichtensteiger *et al.*, 1993; Blacklaws *et al.*, 1994) que são responsáveis pela destruição de células infectadas, porém não destroem as que não expressam as proteínas víricas. Os anticorpos passivos adquiridos pela ingestão de colostro persistem em níveis detectáveis no soro de cabritos e cordeiros por menos de seis meses (Adams *et al.*, 1983; Mackenzie *et al.*, 1987; Cutlip *et al.*, 1988).

Tizard (1985) afirma que a resposta imune contra os vírus pode ser observada de duas formas principais, contra as proteínas do vírus, principalmente do capsídeo e

envelope como no caso do MVV, ou impedindo a infecção da célula alvo pelo vírus. Esse impedimento da infecção celular pode ocorrer através do bloqueio da adsorção de um vírus recobrando a célula alvo, iniciando a virólise mediada pelo complemento, causando agrupamento dos vírus reduzindo assim o número de unidades infectantes disponíveis, ou pelo estímulo da fagocitose dos vírus pelos macrófagos.

O MVV replica-se em células da linhagem monócito/macrófago e não em linfócitos. Isto sugere que a replicação viral em ovinos infectados no início induz a proliferação de células T e B, formando nódulos linfóides peribroncovascular típicos com centros germinais contendo acúmulo de células T CD4<sup>+</sup>. Estes centros germinais podem relatar a interação de linfócitos com células dendríticas que são infectadas pelo MVV (Mornex *et al.*, 1994).

Alguns vírus têm a capacidade de se evadir da resposta do hospedeiro por diversos mecanismos. Os lentivírus em especial fazem essa evasão principalmente pela variação antigênica. Na infecção pelo MVV os anticorpos neutralizantes são produzidos lentamente. Como resultado, a seleção de novas variantes virais é ineficiente, e os vírus antigenicamente diferentes só surgem de forma lenta. Esses anticorpos neutralizantes são incapazes de reduzir a carga viral no ovino afetado, não ocorrendo assim recidivas cíclicas como no caso da AIE. Estes anticorpos neutralizantes possuem uma afinidade muito baixa por seus epítopos e levam 20 minutos para se conjugar com o vírus e 30 minutos para neutralizá-lo, enquanto o vírus leva apenas 2 minutos para infectar uma célula. Desta forma o mesmo consegue se espalhar mais rapidamente, entre as células, que a sua neutralização (Tizard, 1998).

Jolly *et al.*, (1989) investigando a ação de anticorpos neutralizantes sobre a replicação do MVV em culturas celulares de fibroblastos e de macrófagos, constataram que quando se acrescentava alta concentração de anticorpos (Ac) neutralizantes nas culturas a taxa de replicação do mesmo era bastante diminuída, porém este efeito era bem mais significativo na cultura de fibroblastos, sendo que na cultura de macrófagos os títulos do vírus permaneceram elevados. Este fato da ação menos eficiente dos Ac neutralizantes nos macrófagos pode ser considerado um dos motivos pelos quais haja uma persistência da infecção *in vivo* mesmo na presença de grandes concentrações de anticorpos neutralizantes circulantes.

Diferentemente das lentivirose de primatas, que afetam primariamente os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e macrófagos, levando a uma diminuição da resposta imune principalmente pela infecção das células CD4<sup>+</sup> com sua consequente morte, o MVV não apresenta afinidade por este tipo celular, provavelmente pela ausência de receptores moleculares na superfície destas células para que o vírus sofra aderência. Esta ausência de adesão às células CD4<sup>+</sup> pode explicar o fato da Maedi-Visna não acarretar uma imunossupressão acentuada como nas lentivirose de primatas (Gorrel *et al.*, 1992).

A habilidade para replicar em macrófagos e a dependência de replicação viral na maturação celular são os fatores chaves na patogênese de doenças causadas pelos LVPR. Macrófagos são células de vida longa que derivam de promonócitos na medula óssea, circulando como monócitos no sangue e são distribuídos para todo tecido no corpo que são maturados e diferenciados em macrófagos teciduais. Promonócitos infectados latentemente pode ser detectado na medula óssea de animais infectados experimentalmente logo após inoculação e durante todo o curso da doença (Lairmore *et al.*, 1987).

Devido a replicação viral ser maturação dependente, estas células imaturas da linhagem macrófago pode permanecer latentemente infectados por longos períodos de tempo. Na ausência de expressão de antígeno viral, o hospedeiro é incapaz de detectar o vírus. A medula óssea então age como um reservatório de vírus, continuamente libera monócitos infectados latentemente para o sangue periférico os quais são então distribuídos por todo o corpo. Quando as células maturam no tecido, a expressão gênica viral é regulada e o sistema imune do hospedeiro é então exibido para o antígeno viral (Zink & Johnson, 1994).

Jan *et al.*, (2000) verificaram *in vitro*, que as células endoteliais vasculares infectadas apresentam capacidade de ligação aos leucócitos duas vezes maiores que as células não infectadas e que as mesmas mantiveram a expressão de marcadores, aumentaram inicialmente a expressão de antígeno MHC- I e posteriormente MHC – II. Tais eventos podem contribuir para a distribuição de células linfóides nos tecidos e para demonstrar uma resposta imune local na infecção dos LVPR.

### 2.2.7. Sintomatologia

A infecção por MVV, geralmente persistente e assintomática, pode causar afecção multissistêmica, de evolução geralmente crônica, com agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade até a morte. As apresentações clínicas têm sido classificadas em quatro formas básicas: nervosa, artrítica, respiratória e mamária (Narayan & Cork, 1985; Dawson, 1987; Peretz *et al.*, 1993). A apresentação pulmonar é muito freqüente e grave em ovinos, cujos sintomas são tosse, dispnéia após exercícios físicos, taquipnéia e consolidação pulmonar (Narayan & Cork, 1985; Cutlip *et al.*, 1988). Além desta sintomatologia, o animal afetado pode apresentar também aumento dos linfonodos, articulações e tecido periarticular e uma perda de peso acentuada (Lairmore *et al.*, 1988).

O pulmão é o principal alvo para infecções oportunistas e desordens linfoproliferativas em indivíduos infectados por lentivírus. O tempo de sobrevivência de ovinos com pneumonia intersticial linfóide induzida por lentivírus ovino não é bem estabelecido, entretanto tem sido relatado que após o início dos sinais clínicos a morte é inevitável e o curso da doença é geralmente maior ou igual a seis meses. Nesse estudo, sinais clínicos respiratórios estavam presentes em 24% da população estudada. Todos esses animais foram soropositivos para a lentivirose ovina (LVOv), demonstravam pneumonia intersticial linfóide, e 50% tiveram evidências histológicas de ocorrência de infecções respiratórias (Brodie *et al.*, 1992).

A forma mamária não é freqüente e predispõe a infecções secundárias. Os animais afetados apresentam mamite aguda ou crônica. A aguda é observada no início da lactogênese, havendo endurecimento não edematoso do órgão, com baixa ou nenhuma produção leiteira. A crônica instala-se durante a lactação com assimetria e endurecimento da mama e leite de aspecto normal. Em ambas formas há hipertrofia persistente dos linfonodos retromamários (Oliver *et al.*, 1981; Cutlip *et al.*, 1988).

A forma nervosa é de menor importância, tendo sido relatada em ovinos adultos, geralmente como complicação da forma respiratória (Narayan & Cork, 1985; Constable *et al.*, 1996). Os animais, mesmo mantendo o apetite e estando alerta, apresentam ataxia e paresia uni ou bilateral dos membros posteriores, que evolui para tetraparesia (Narayan & Cork, 1985; Cutlip *et al.*, 1988).

A forma artrítica é pouco freqüente, acometendo animais de dois a três anos, freqüentemente como complicação da forma respiratória (Oliver *et al.*, 1981). As alterações clínicas afetam freqüentemente as articulações carpianas, sendo observado aumento na consistência e tamanho das articulações (Crawford & Adams, 1981; Oliver *et al.*, 1981, Gonzalez *et al.*, 1987, Cutlip *et al.*, 1988).

#### **2.2.8. Alterações patológicas**

À necropsia, observam-se aderências pleurais, pulmões pesados e firmes à palpação e áreas de coloração róseo-acizentadas (Robinson & Ellis, 1984; Narayan & Cork, 1985; Cutlip *et al.*, 1988). Além disso, os pulmões não entram em colapso quando o tórax é aberto. Esses órgãos têm uma consistência densa, mas não parecem estar consolidados. Todos os lobos pulmonares apresentam-se com uma coloração acizentada e consistência igualmente uniformes. Os pulmões estão distendidos, parecem aumentados, e na verdade pesam duas a cinco vezes mais que os pulmões normais dos ovinos, normalmente 300 a 500g (Jones *et al.*, 2000).

As lesões microscópicas no pulmão revelam que a perda da elasticidade e da compressibilidade, e também a cor acizentada são causadas por um aumento na espessura das paredes alveolares. Esse espessamento pode ser tão grande que os espaços alveolares ficam obliterados. O espessamento é causado pela proliferação e infiltração de células reticuloendoteliais ou mesenquimatosas que invadem os septos em todos os locais. Como ocorre em muitos tipos de proliferação reticuloendotelial, as células variam, desde grandes formas mononucleares redondas, algumas das quais parecendo ser macrófagos, até células fibroblásticas curtas. A musculatura lisa dos dutos alveolares e bronquíolos terminais está hiperplásica. Os nódulos linfáticos ocorrem ao longo do curso dos brônquios e bronquíolos. As células de revestimento dos alvéolos próximos aos brônquios tendem a sofrer tumefação e tornar-se cubóides (Jones *et al.*, 2000). Dessa forma pode-se notar a presença de uma pneumonia intersticial com infiltração leucocitária e hiperplasia de tecidos linfóides (Luján *et al.*, 1991).

A lentivirose ovina causa lesões inflamatórias e linfoproliferativas multissistêmicas. As duas manifestações patológicas primárias são alveolite linfocítica

e pneumonia intersticial linfóide (Brodie *et al.*, 1992). As lesões macroscópicas de pneumonia progressiva são restritas aos pulmões e linfonodos associados. Os linfonodos mediastínicos e traqueobronquiais estão aumentados e edematosos. As alterações histológicas que se estendem por todo o pulmão são de pneumonia intersticial, hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial, e hipertrofia do músculo liso (Fraser, 1991).

Na Maedi-Visna, o tecido linfóide é organizado em nódulos cercado os bronquíolos e vasos (Mornex *et al.*, 1994). A manifestação mais comum de infecção lentiviral em ovinos é a pneumonia intersticial crônica caracterizada por espessamento, frequentemente fibrótico e intersticial denso, do septo interalveolar, perivascular e infiltrado peribronquial de linfócitos e macrófagos. Um pequeno percentual de animais infectados tem artrite, com maior ocorrência na articulação carpal, mas ocasionalmente envolvendo a articulação fêmuro-tíbio-patelar. As articulações afetadas apresentam hiperplasia da membrana sinovial com aumento no acúmulo de linfócitos. Na forma neurológica as lesões macroscópicas são pouco evidentes (Zink & Johnson, 1994). As lesões microscópicas são de meningoencefalite e desmielinização (Norman & Smith, 1983; Constable *et al.*, 1996).

Nas glândulas mamárias pouca ou nenhuma lesão macroscópica é observada, enquanto que microscopicamente pode-se observar obstrução parcial dos ductos lactíferos por proliferação de tecido linfóide (Luján *et al.*, 1991).

Nos linfonodos ocorre uma hiperplasia folicular generalizada e infiltrados linfóides podem ser detectados em praticamente todos os órgãos (Ellis & DeMartini, 1985).

### **2.2.9. Diagnóstico**

Pelas características da infecção persistente a forma mais prática de diagnóstico é a sorologia, uma vez que a presença de anticorpos demonstra indiretamente a existência de infecção. A detecção de anticorpos contra MVV na fase inicial da doença é amplamente dependente da sensibilidade e especificidade do teste usado, podendo 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). Por outro lado, o diagnóstico da infecção pelo isolamento e identificação do agente não é rotineiramente empregado por ser demorado e bastante dispendioso, mesmo havendo disponíveis células de linhagens permissíveis à infecção (Callado *et al.*, 2001).

Atualmente utilizam-se técnicas de diagnóstico que possuam boas especificidade e sensibilidade, sejam elas sorológicas e/ou virológicas como: isolamento do vírus e sua identificação morfológica e protéica, provas moleculares 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).

A seguir serão apresentadas as principais formas de diagnóstico da Maedi-Visna.

#### **2.2.9.1. Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)**

Dentre os testes sorológicos disponíveis, o IDGA é o recomendado pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) para o diagnóstico de lentivirose de pequenos ruminantes, inclusive Maedi-Visna. Apresenta uma ampla utilização principalmente como teste de triagem em programas de controle devido a sua aplicabilidade e alta especificidade (Moojen, 1998, Varea *et al.*, 2001). O IDGA foi um dos primeiros testes sorológicos que demonstrou sucesso no diagnóstico de Maedi-Visna, tendo sido desenvolvido para detectar anticorpos específicos contra o MVV. O mesmo apresenta baixo custo, é comercialmente disponível e de fácil execução, tornando-o assim a técnica de diagnóstico sorológico para Maedi-Visna mais comumente usada (Simard & Briscoe, 1990; Marcom *et al.*, 1992; Brodie *et al.*, 1993; Knowles *et al.*, 1994).

Entretanto, a identificação de animais na fase inicial da infecção é limitada uma vez que esta técnica apresenta pouca sensibilidade, pois se observa uma baixa concentração de anticorpos nesta fase da doença (Brodie *et al.*, 1998; De la Concha-Bermejillo, 1997).

A técnica baseia-se na reação de precipitação que resulta na formação de uma linha única de identidade entre o antígeno e o anticorpo existente no soro do animal

testado, tendo como padrão as linhas únicas formadas entre os soros de referência positivos (Cutlip *et al.*, 1977).

Em estudo realizado para o diagnóstico do MVV por IDGA, Klein *et al.*, (1985) verificaram diferenças biológicas significativas entre amostras de laboratório e isolados de campo, o que certamente influencia a resposta imune e o resultado dos testes.

#### **2.2.9.2. Histopatologia**

Este exame informa a natureza, gravidade, extensão, evolução e intensidade das lesões, além de sugerir ou até mesmo indicar a causa da afecção (Vasconcelos, 1988).

Em 1971, Georgsson & Pálsson fizeram um estudo histopatológico em ovinos infectados natural e experimentalmente com MVV e obtiveram como principais achados uma inflamação intersticial crônica com densa infiltração celular, hiperplasia do músculo liso no septo alveolar e hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial. Com o passar do tempo à análise histopatológica passou a ser utilizada como um auxílio ao diagnóstico, uma vez que a mesma não é conclusiva, mesmo quando associada ao conhecimento do quadro clínico e epidemiológico.

Luján *et al.*, (1991) analisando mudanças patológicas nos pulmões e glândulas mamárias de ovinos infectados com o MVV verificaram hiperplasia de folículos linfóides e infiltrado intersticial, respectivamente.

O exame histológico de tecidos pulmonares e mamários de ovinos naturalmente infectados revelou a presença de fatores tipicamente associados com o MVV. Os pulmões apresentaram infiltração difusa de células linfóide e macrófagos no interstício pulmonar, com acúmulo peribronquiolar e perivascular local. A glândula mamária mostrou pronunciada hiperplasia linfóide e infiltração de células mononuclear (Carrozza *et al.*, 2003).

#### **2.2.9.3. Imunohistoquímica**

A imunohistoquímica é o conjunto de procedimentos que utiliza anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos presentes nos tecidos. Os antígenos podem representar constituintes celulares normais ou pertencer a um

elemento estranho à célula. A imunohistoquímica é uma técnica essencialmente qualitativa cujo objetivo fundamental é o encontro e localização topográfica de antígenos nos tecidos. Os anticorpos empregados podem ser mono ou policlonais. Em vez de anticorpos purificados, muitas vezes se utiliza um anti-soro como reagente primário, implicando a presença de anticorpos policlonais. A principal vantagem dos anticorpos monoclonais é a sua elevada especificidade. A partir da década de 1960, surgiram as técnicas imunoenzimáticas, ou seja, as que empregam imunoglobulinas marcadas com enzimas. Nesse caso, o sinal encontrado depende da formação de um composto colorido no local da reação, o qual é gerado pela ação da enzima sobre um substrato apropriado (Brasileiro Filho *et al.*, 2000).

Entre as vantagens da imunohistoquímica estão a estabilidade das preparações e a possibilidade de se utilizar o microscópio óptico comum, além de ser tão específica e sensível quanto a técnica de imunofluorescência (Nakane & Pierce, 1967).

A investigação dos tipos celulares que abrigam o genoma do vírus em glândula mamária e pulmões de ovinos naturalmente infectados com o MVV usando o PCR *in situ* associado a imunohistoquímica foi objetivo do trabalho desenvolvido por Carrozza *et al.*, (2003), onde encontraram o genoma viral nos pneumócitos do tipo I e II, macrófagos alveolares e intersticiais e células endoteliais. Células epiteliais, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos foram as células infectadas presentes na glândula mamária.

Prezioso *et al.*, (2003) analisando ovinos infectados experimentalmente com MVV, através da técnica de imunohistoquímica, verificaram a presença de imunomarcadores citoplasmáticos nas células pulmonares, linfonodos pulmonares, e úbere de todos os animais infectados independentemente da severidade das lesões.

#### **2.2.9.4. 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 observável a olho nu e quantificado mediante o uso de um espectrofotômetro (Roitt *et al.*, 1998).

Houwers *et al.*, (1982) desenvolveram um ELISA para a detecção de anticorpos para o MVV com um antígeno parcialmente purificado. Comparando com o IDGA e o teste de fixação de complemento (FC), verificaram que todas as amostras positivas no IDGA, FC ou ambas também foram positivas no ELISA. Em adição, o ELISA detectou mais 11,5% de soropositivos.

Rosati *et al.*, (1994) desenvolveram, para detecção de anticorpos para o lentivírus ovino, dois testes ELISA, um preparado a partir da partícula viral completa (ELISA-VC) e outro baseado na proteína transmembranar recombinante (ELISA TM-r) e foram confrontados com o IDGA. A sensibilidade do ELISA TM-r foi superior ao IDGA, mas inferior ao ELISA-VC, particularmente para detecção de anticorpos em estágios iniciais da infecção. Os autores ressaltam que a proteína transmembrânica é um importante marcador imunológico na infecção dos LVPR, mas é pouco representativa em preparações de antígeno convencional, não estando claro se esta proteína do lentivírus ovino cepa K1514 pode ser usada como um antígeno universal para detecção de infecção ovina em diferentes áreas geográficas.

#### **2.2.9.5. 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, para retornarem ao seu estado normal tais substâncias passam a liberar energia na forma de fluorescência. Os fluorocromos mais comuns são os do grupo da rodamina e o isotiocianato de fluoresceína (Schade, 1995).

São poucos os trabalhos empregando RIFI no diagnóstico dos lentivírus de pequenos ruminantes. No Brasil, Reischak *et al.*, (2002) desenvolveram uma RIFI utilizando três vírus isolados brasileiros de caprinos e um de ovino e compararam os resultados com o teste de IDGA usando antígeno do MVV. Em amostras de soro

caprino e ovino, verificou-se que a RIFI detectou mais animais soropositivos que o IDGA, também foram obtidos resultados diferentes de acordo com as cepas virais isoladas e os tipos celulares empregados.

#### **2.2.9.6. Isolamento em Cultivo Celular**

O isolamento viral em cultivo celular é considerado um teste padrão de diagnóstico em virologia. No entanto, a técnica apresenta algumas restrições, uma vez que é demorada, dispendiosa, necessita da implantação de cultivos celulares especiais. Além disso, é incapaz de detectar vírus que não cause efeito citopático (Knowles, 1997).

Este método de diagnóstico é de grande sensibilidade para alguns agentes virais, consistindo em manter o material infectado em contato com cultivos celulares susceptíveis *in vitro*, para que o vírus se multiplique e possa ser detectado através da presença de efeito citopático (ECP) característico, ofertando-se aos cultivos condições semelhantes às propriedades físicas, químicas e nutricionais às encontradas *in vivo*. Geralmente os LVPR podem ser isolados de animais vivos pelo co-cultivo de células como leucócitos do sangue periférico, células somáticas do leite, células do plexo coróide de ovinos para o MVV e células de membrana sinovial caprina (MSC) para o CAEV. De animais mortos infectados o vírus pode ser isolado a partir de *esplants* de tecidos como membrana sinovial, glândula mamária, pulmão, plexo coróide e tecidos linfóides. Os principais ECP, no caso do lentivírus, é a formação de sincícios e/ou lise celular intensa com destruição de grande parte da monocamada celular. *In vitro*, células infectadas com lentivírus têm a propriedade de induzir a fusão celular e posterior formação do sincício em células não infectadas, porém estas se unem através de receptor para glicoproteína de superfície presente na célula infectada (Daniel *et al.*, 1984; Gonda *et al.*, 1987). Posteriormente, os sincícios tendem a se dissociar ou desintegrar-se, sendo o monitoramento diário um fator crítico na observação da formação do sincício (Pawlish & Maes, 1984).

O primeiro relato de ECP dos LVPR foi descrito por Sigurdardóttir & Thormar (1964) num rebanho afetado por Maedi a partir de pulmões de ovinos. No Brasil, Hötzel *et al.*, (1993) verificaram ECP característico de lentivírus em cultivo celular de

MSC, obtido a partir de um caprino sorologicamente positivo para o CAEV. Sincícios foram encontrados 14 dias após a inoculação dos cultivos primários. Milczewski *et al.*, (1997) isolaram o MVV pela primeira vez no Estado do Paraná a partir das articulações e glândula mamária de um ovino com artrite, perda de peso progressiva, tosse, corrimento nasal, mamite e sorologia positiva para LVPR. Almeida (2003) fez isolamento de MVV no Estado do Ceará de animais naturalmente infectados.

#### **2.2.9.7. Microscopia Eletrônica (ME)**

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 ópticos (Almeida & Lima, 2001).

Desta forma, as novas estruturas e seus componentes moleculares tem aparecido com a ajuda do microscópio eletrônico, abrindo assim novos campos de interpretação, tanto das células, quanto das 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).

Em 1976, Cutlip & Laird, estudando células embrionárias de pulmão ovino infectadas com o MVV, observaram, por ME, vários brotamentos virais com 120 a 140  $\eta\text{m}$  de diâmetro além de virions livres no espaço extracelular, medindo de 80 a 110  $\eta\text{m}$  de diâmetro, e, virions e fragmentos virais no citoplasma de células infectadas. Já em 2003, Almeida isolou o MVV de animais naturalmente infectados e, por meio da ME, encontrou partículas de 80  $\eta\text{m}$  de diâmetro.

#### **2.2.9.8. Hibridização *in situ* (HIS)**

Segmentos específicos de ácido nucléico de origem viral encontrados em tecidos ou células infectados são capazes de serem detectados por sondas marcadas por enzimas ou radioativamente através da HIS (Brown, 1998). As sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do

DNA ou RNA que se deseja identificar. A HIS é mais sensível que a imunohistoquímica, porém menos sensível que a PCR. A técnica de HIS é utilizada principalmente para a detecção de vírus e outros agentes infecciosos em tecidos suspeitos de infecção, além de cromossomos e produtos da síntese celular. Pode ser realizada em material fixado em formol e incluído em parafina, bem como congelado ou preparados citológicos (Campos, 2004).

#### **2.2.9.9. Dot-Blot ou Dot-imunoblotting**

O Dot-imunoblotting pode ser usado como método qualitativo para separar rapidamente um grande número de amostras em razão da presença de ação do antígeno ou anticorpo, ou como uma técnica quantitativa para determinação da concentração de antígeno. Amostras são aplicadas em uma tira de nitrocelulose e secas, a seguir a membrana é bloqueada, coberta com anticorpos e analisada por um dos sistemas de detecção. A técnica é usada, como um método qualitativo, para avaliar os vários parâmetros que afetam a qualidade do imunoblotting após a transferência do antígeno para a membrana. Por diluição seriada do antígeno, a sensibilidade de um dado sistema pode ser determinada (Stott, 1989).

#### **2.2.9.10. Western blotting ou Imunoblotting**

O Imunoblotting, em princípio, pode ser delineado como método onde proteínas (anticorpos séricos ou plasmáticos) podem ser imobilizadas em uma membrana e transferidas por capilaridade, difusão ou forças elétricas. As forças de ligação da membrana podem ser de natureza covalente ou não-covalente. O material protéico deve ser separado antes da transferência por eletroforese. 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. 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 (Pinheiro, 2001).

### **2.2.9.11. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)**

Vários trabalhos têm demonstrado com sucesso o uso da técnica de PCR na detecção do DNA proviral dos LVPR. A PCR permite a amplificação direta de parte do ácido nucléico viral de fluidos e tecidos de um animal infectado (Zanoni *et al.*, 1990; Reddy *et al.*, 1993; Rimstad *et al.*, 1993; Wagter *et al.*, 1998). A PCR tem sido utilizada em alguns laboratórios de forma mais restrita, pois é um teste caro, no entanto possui alta sensibilidade e especificidade sendo indicado para animais de alto valor zootécnico e para as amostras em que os resultados de outros testes foram inconclusivos (Moojen, 2001).

A detecção de infecção por LVPR através de PCR é indicativa de uma infecção persistente e é dependente da quantidade amplificada da seqüência alvo e da especificidade do *primer*. Entretanto 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 (Knowles, 1997).

Devido à alta variabilidade genômica dos lentivírus, a escolha dos *primers* em genes relativamente conservados como *pol*, *gag* e da LTR, combinado a condições de reação para a máxima sensibilidade é decisiva para detecção de um grande espectro de cepas de campo de ambos CAEV e MVV (Zanoni, 1998).

### **2.2.10. Transmissão**

A transmissão vertical é a de maior importância e ocorre principalmente via colostro e leite de fêmeas infectadas (Blacklaws *et al.*, 2004), sendo facilitada em animais com mastite (Zink & Johnson, 1994). A infecção pode ser adquirida, também, por contato direto prolongado entre animais infectados e susceptíveis, onde os primeiros eliminam vírus juntamente com secreções nasais e aerossóis (Moojen, 2001).

Em ovinos, a transmissão através de aerossóis ou secreções respiratórias já foi comprovada tanto experimentalmente (Narayan & Clements, 1989) quanto naturalmente (De la Concha-Bermejillo, 1997). Há evidências que indicam a

transmissão materno-fetal dos LVPR ocorra, mesmo com baixa incidência (East *et al.*, 1993), podendo ocorrer através de duas possíveis vias: transmissão intra-uterina e/ou no canal vaginal no momento do parto, e mediante a ingestão ou inalação de células contaminadas pelas crias.

A transmissão do LVPR via sêmen ainda não foi definitivamente comprovada, apesar do MVV já ter sido isolado no sêmen de animais infectados (De la Concha-Bermejillo *et al.*, 1996).

### **2.2.11. Controle e profilaxia**

Os programas de controle ou erradicação da infecção ocasionada pelo MVV têm sido adotados em vários países, geralmente de adesão voluntária, baseados no teste periódico dos animais, com separação ou eliminação dos soropositivos, e uso de certas práticas de manejo para prevenção da disseminação do agente. De acordo com De la Concha-Bermejillo (1997) e Rowe & East (1997) nos plantéis suspeitos ou comprovadamente positivos, algumas recomendações têm sido adotadas, com resultados bastante variados, são elas:

- ◆ Separar as crias imediatamente após o nascimento, evitar o contato com secreções maternas e isolá-las dos adultos;
- ◆ Administrar colostro termicamente tratado, de mães não infectadas;
- ◆ Alimentar as crias com substituto do leite;
- ◆ Testar os animais a intervalos regulares e separar ou eliminar os positivos;
- ◆ Usar material estéril, como seringas, agulhas e instrumentos cirúrgicos.

A técnica de PCR pode ser utilizada quando um controle mais rigoroso de Maedi-Visna está sendo almejado, de forma que, quando os animais de determinado rebanho apresentarem sorologia negativa para enfermidade este controle passe a ser feito com o PCR, que se constitui num método de diagnóstico mais eficaz na detecção de falsos negativos (Knowles, 1997).

### **3. Justificativa**

Maedi-Visna é uma doença de caráter crônico que ocasiona prejuízos econômicos na ovinocaprinocultura, uma vez que a inexistência de vacinas bem como de quimioterápicos efetivos faz com que o diagnóstico precoce com eliminação dos animais positivos seja a forma de controle mais adequada. Vários são os métodos diagnósticos utilizados, sendo o IDGA o mais simples e exequível, com alta especificidade e baixa sensibilidade. O pulmão é o principal órgão-alvo para infecções linfoproliferativas em indivíduos infectados pelo MVV, por isso a utilização deste órgão no presente trabalho. No Brasil há trabalhos demonstrando a existência de anticorpos para LVPR em ovinos, no entanto há poucas evidências de ocorrência de doença clínica. Este trabalho foi realizado para determinar a presença de lesões pulmonares macro e microscópicas em animais com anticorpos contra MVV.

#### **4. Hipótese científica**

Animais oriundos de abatedouros, sorologicamente positivos para a infecção pelo MVV através da técnica de IDGA, apresentam lesões pulmonares condizentes com a Maedi-Visna.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Geral**

Identificar o Maedi-Visna Vírus e lesões pulmonares sugestivas da doença em ovinos naturalmente infectados.

### **5.2. Específicos**

- ◆ Determinar a presença de anticorpos específicos para Maedi-Visna Vírus pelo teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA).
- ◆ Analisar as principais lesões macro e microscópicas pulmonares de ovinos com sorologia positiva para Maedi-Visna.

## **6. Material e Métodos**

### **6.1. Amostras**

Foram coletadas 223 amostras de soro e fragmentos pulmonares de animais da espécie ovina, dos quais 72 eram machos e 145 fêmeas, SRD, com idade entre 1 e 5 anos, provenientes de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza. As amostras de sangue ovino foram coletadas por venopunção jugular utilizando-se tubos vancuntainer descartáveis não-heparinizados, os quais eram acondicionados em caixa de material isotérmico, contendo gelo, e remetidas ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará para centrifugação e obtenção do soro, sendo este alíquotado em tubos eppendorf, congelado e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Durante o abate os pulmões eram avaliados macroscopicamente quanto a coloração, textura e consistência.

### **6.2. Técnica de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA)**

A sorologia para infecção pelo Maedi-Visna Vírus foi realizada pelo método de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), que consiste na detecção de linhas de precipitação nos casos positivos, decorrentes da reação antígeno-anticorpo.

Para a execução do teste de IDGA utilizaram-se placas de petri descartáveis de 90x15mm com agarose a 1%. Após a solidificação do gel de agarose as placas eram perfuradas com roseta metálica padrão que possui sete perfurações, de 4 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre as bordas, sendo uma central e seis periféricas equidistantes. Os reagentes eram distribuídos de acordo com a seguinte seqüência: nas seis cavidades periféricas, de maneira alternada, 20  $\mu\text{l}$  do soro teste e 20  $\mu\text{l}$  do soro controle positivo, e 20  $\mu\text{l}$  do antígeno na cavidade central.

Os kits contendo o antígeno, soro padrão positivo e o ágar, utilizados no teste diagnóstico, foram adquiridos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (Abreu *et al.*, 1998).

Após a deposição de todos os componentes nas placas, estas foram acondicionadas em câmara úmida, a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) por 48 horas.

As reações eram avaliadas pela presença de linha de precipitação, obtida entre o antígeno e o soro controle positivo. Onde os possíveis resultados a serem encontrados são as seguintes:

- Reação negativa: ausência de formação de linha de precipitação entre o antígeno e o soro teste.
- Reação positiva: as linhas formadas entre o Ag e o soro controle positivo fundem-se com aquelas formadas pelas amostras testadas dando origem a uma linha contínua de identidade total.
- Reação inespecífica: não há formação de uma linha contínua. As linhas inespecíficas são formadas por outras reações Ag-Ac que não aquela específica para Maedi-Visna.

### **6.3. Histopatologia**

Após a avaliação macroscópica foram retirados fragmentos de 2x2cm em cortes transversais e longitudinais. Estes foram colocados em frascos contendo formalina a 10%, neutra e tamponada onde permaneceram até o resultado da sorologia, uma vez que as amostras sorologicamente positivas para Maedi-Visna Vírus tiveram seus pulmões processados. O grupo controle negativo consistiu no mesmo número de amostras soropositivas, cujos pulmões foram devidamente processados. Os fragmentos pulmonares foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados e incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados à espessura de 5µm e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE), segundo Luna (1968) e examinadas ao microscópio óptico.

### **6.4. Análise Estatística**

A prevalência por sexo foi submetida ao teste não-paramétrico qui-quadrado ( $X^2$ ) adotando-se o nível de significância igual a cinco por cento, conforme recomendado por Spiegel, (1985).

## 7. Resultados e Discussão

A análise sorológica para infecção pelo MVV, realizada através do teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), nos 223 ovinos testados revelou um percentual de 5% (n=11) de animais soropositivos para a infecção pelo MVV, sendo 6 (8,33%) machos de um total de 72 e 5 (3,45%) fêmeas de um total de 145, não havendo diferença significativa entre os sexos. Esta prevalência foi inferior a encontrada por Almeida *et al.*, (1999) de 31,67% em ovinos abatidos na região metropolitana de Fortaleza-CE, que apresentavam lesões macroscópicas de pneumonia e artrite. Por outro lado Silva (2003), em levantamento sorológico realizado, em ovinos criados de forma extensiva, no Estado do Rio Grande do Norte encontrou uma prevalência de 21,3% de animais soropositivos. A diferença entre os resultados encontrados pode ser justificada pela procedência dos animais amostrados, uma vez que os utilizados no presente trabalho eram ovinos sem lesões pulmonares ou articulares provenientes de abatedouros, ao contrário do resulta obtido por Almeida *et al.*, (1999) em animais com lesões. As diferenças da prevalência observadas por Silva (2003) pode ser devida a idade dos animais amostrados, uma vez que dos 223 amostrados, 221 não tinham completado a dentição (<4 anos), enquanto que as amostras analisadas por Silva (2003) foram coletadas nas fazendas incluindo animais adultos. Desta forma como a Maedi-Visna é caracterizada por ser crônica, devido ao seu longo período de incubação (Pepin *et al.*, 1998) a mesma tem uma maior prevalência em animais na idade adulta (Arsenault *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul em um levantamento realizado em 16 municípios do Estado foi encontrado uma prevalência de 10,48%. de animais soropositivos (Dal Pizzol *et al.*, 1989). Em outro trabalho no mesmo Estado foi encontrado uma prevalência de 19%. (Ribeiro, 1993). Ambos os levantamentos foram realizados em fazendas com histórico de importação de ovinos.

Outro fator que pode influir na detecção de animais soropositivos é o antígeno utilizado, sendo que os antígenos específicos produzido com MVV apresentam uma sensibilidade 35% maior que os antígenos heterólogos, como o produzido com o CAEV (Knowles 1997). Neste trabalho foi utilizado um antígeno específico p28. No

entanto Adams & Gorham (1986) relatam que a gp 135 confere maior sensibilidade à técnica de IDGA que a p28.

Não foram encontradas lesões macroscópicas semelhantes às observadas em Maedi-Visna nos pulmões dos animais abatidos. Na Maedi-Visna observam-se aderências pleurais, pulmões pesados e firmes à palpação e áreas múltiplas de coloração róseo-acizentadas (Robinson & Ellis 1984, Narayan & Cork 1985, Cutlip *et al.*, 1988). Além disso, os pulmões não colapsam quando o tórax é aberto. Esses órgãos têm uma consistência densa, mas não parecem estar consolidados. As lesões podem ser encontradas em todos os lobos pulmonares. Os pulmões estão distendidos, parecem aumentados, e pesam duas a cinco vezes mais que os pulmões normais dos ovinos, normalmente de 300 a 500g. (Jones *et al.*, 2000).

Também não foram encontradas lesões histológicas características de MV nos pulmões dos animais soropositivos e nem do grupo controle. Foram observadas, ocasionalmente, infiltração linfocitária multifocal de localização preferencial peribronquial e perivascular, áreas de espessamento do septo alveolar com ocasional infiltração linfocitária e áreas de atelectasia e enfizema. As alterações histológicas da MV caracterizam-se por pneumonia intersticial crônica com espessamento freqüentemente fibrótico do septo intralveolar, Há hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial, e hipertrofia do músculo liso (Fraser, 1991).

Os resultados deste trabalho confirmam que infecções por MVV podem ocorrer sem sinais clínicos aparentes e lesões macroscópicas ou histológicas nos ovinos dos rebanhos afetados. No Brasil não foi determinado se estas manifestações subclínicas são causadas por LVPR do tipo I grupo MVV ou do tipo II grupo CAEV. A presença de anticorpos contra LVPR em ovinos foi detectada no Rio Grande do Sul (Dal Pizzol *et al.*, 1989, Ribeiro, 1993), Ceará (Almeida, 1999) e Rio Grande do Norte (Silva, 2003) e o vírus foi isolado no Paraná (Milczewski *et al.*, 1997) e Ceará (Almeida, 2003). O vírus isolado do Paraná, de um ovino com mastite e artrite foi identificado filogeneticamente como pertencente ao prototipo Maedi-Visna (Ravazolo *et al.*, 2001), enquanto que o vírus isolado no Ceará, proveniente de um ovino com lesões pulmonares de Maedi-Visna (Almeida, 2003), não foi estudado filogeneticamente. Por outro lado, amostras de LVPR isoladas de caprinos no Brasil demonstraram ser

filogeneticamente pertencentes ao grupo Maedi-Visna, sugerindo a ocorrência de transmissão de LVPR de caprinos para ovinos e vice-versa e a possibilidade de recombinação entre amostras ovinas e caprinas (Castro *et al.*, 1999). Esses resultados demonstram que, no Brasil, apesar da presença de anticorpos para MV, os sinais clínicos e a patologia da doença tem sido raramente observadas. O diagnóstico sistemático das afeções respiratórias, das articulações, da glândula mamária e do sistema nervoso central de ovinos é necessário para determinar a importância de MV para a ovinocultura em diferentes regiões do País.

## **8. Conclusões**

A avaliação dos resultados da identificação do Maedi-Visna Vírus em pulmão de ovinos naturalmente infectados, nos permite chegar às seguintes conclusões:

1. A prevalência de infecção por Maedi-Visna nas amostras pesquisadas foi de 5%.
2. O sexo não influenciou na prevalência da infecção pelo MVV.
3. Não ocorreram lesões macroscópicas e histopatológicas características de Maedi-Visna nos animais sorologicamente positivos.

## Referências Bibliográficas

- ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A. produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus maedi-visna para imunodifusão em ágar-gel. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 18, n. 2, p. 57-60, 1998.
- ADAMS, D. S.; GORHAM, J. R. The gp 135 of caprine arthritis encephalitis virus afford greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. **Research Veterinary Science**. v. 40, p. 157-160, 1986.
- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, B. S.; McGUIRE, T. C. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal Veterinary Research**. v. 44, p. 1670-1675, 1983.
- ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia**. 1<sup>a</sup> ed. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2001. 186p.
- ALMEIDA, N. C.; APRÍGIO, C. J. L. ; FERREIRA, R. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Levantamento sorológico de lentivírus ovino em animais destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. IV Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, 1999.
- ALMEIDA, N. C. **Isolamento e identificação do vírus Maedi-Visna através de microscopia eletrônica de transmissão de animal comprovadamente soropositivo pelo IDGA**. Fortaleza, 2003. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de veterinária, Universidade Estadual do Ceará.
- ALVES, J. U. A tecnologia na convivência com a seca. [online]. Disponível em: [www.cnpc.embrapa.br](http://www.cnpc.embrapa.br). Acessado em 20 de agosto de 2003.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 59, p. 67-81, 2003.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissue of infected goats. **Journal Virological Methods**. v. 50, p. 101-114, 1994.

- BERTONI, G.; ZAHNO, M. L.; ZONONI, R.; VOGT, H. R.; PETERHANS, E.; RUFF, G.; CHEEVERS, W. P.; SONIGO, P.; PANCINO, G. Antibody reactivity to the immunodominant epitopes of the caprine arthritis-encephalitis virus gp 38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. **Journal Virology**. v. 68, p. 7139-7147, 1994.
- BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N. J.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**. v. 101, n. 3, p. 199-208, 2004.
- BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; McCONNELL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus-infected sheep. **Journal General of Virology**. v. 75, p. 1589-1596, 1994.
- BRASILEIRO FILHO, G.; BARBOSA, A. J. A.; MIRANDA, D. **Métodos de estudo em patologia**. In: BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia*. Guanabara Koogan, 2000. 6-18.
- BRODIE, S. J. 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.
- BRODIE, S. J.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; SNOWDER, G. D. Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: a review. **Small Ruminant Research**. v. 27, p. 1-17, 1998.
- BRODIE, S. J.; MARCOM, K. A.; PEARSON, L. D.; ANDERSON, B. C.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; ELLIS, J. A.; DeMARTINI, J. C. Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 166, p. 531-541, 1992.
- BRODIE, S. J.; PEARSON, L. D.; SNOWDER, G. D. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus infected sheep. **Archives Virology**. v. 130, p. 413-428, 1993.
- BROWN, C. In situ hybridization with riboprobes: an overview for veterinary pathologists. **Veterinary Pathology**. v. 35, n. 3, p. 159-167, 1998.

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

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. n. 21, v. 3, p. 87-97, 2001.

CAMPOS, S. Hibridização *in situ*. [online]. Disponível em: [www.anticorpos.com.br/C\\_hibridiz.htm](http://www.anticorpos.com.br/C_hibridiz.htm). Acesso em 20 de setembro de 2004.

CAPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-Visna Virus detection in ovine third eyelids. **Journal Comparative Pathology**. v. 129, p. 37-43, 2003.

CAREY, N.; DALZIEL, R. G. The biology of Maedi-Visna virus. Na overview. **Brazilian Veterinary Journal**. v. 149, p. 437-454, 1983.

CARROZZA, M. L.; MAZZEI, M.; BANDECCHI, P.; ARISPICI, M.; TOLARI, F. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. **Journal of Virological Methods**. v. 107, p. 121-127, 2003.

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

CASTRO, R. S.; LEITE, R. C.; RESENDE, M.; GOUVEIA, A. M. G. Caprine arthritis-encephalitis virus isolation and identification using fluorescent antibody and polymerase chain reaction. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 3, n. 51, p. 235-240, 1999.

CHEBLOUNE, Y.; KARR, B.; SHEFFER, D.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. **Journal General of Virology**. v. 77, p. 2037-2051, 1996.

CHEEVERS, W.; McGUIRE, T.; NORTON, L. K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES, D. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. **Virology**. v. 196, p. 835-839, 1993.

- CLEMENTS, J. E.; PAYNE, S. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**. v. 32, p. 97-109, 1994.
- CLEMENTS, J. E.; GDOVIN, S. L.; MONTELARO, R. C.; NARAYAN, O. Antigenic variation in lentiviral diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 6, p. 139-159, 1988.
- CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus. **Clinical Microbiology Veterinary**. v. 9, p. 100-117, 1996.
- COFFIN, J. M. **Retroviridae: the viruses and their replication**. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. N. Fields Virology. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1767-1847.
- CONSTABLE, P. D.; MEIER, W. A.; FOLEY, G. L.; MORIN, D.; CUTLIP, R. C.; ZACHARY, J. F. Visna-like disease in a ram with chronic demyelinating encephalitis. **Journal American Veterinary Medicine Assoc.** v. 208, p. 117-120, 1996.
- CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected populations. **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 178, p. 713-719, 1981.
- CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P.; CORK, L. C. 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. **American Journal Veterinary Research**. v. 38, p. 1081-1084, 1977.
- CUTLIP, R. C.; LAIRD, G. A. Isolation and characterizations of a virus associated with progressive pneumonia (maedi) of sheep. **American Journal Veterinary Research**. v. 37, p. 1377-1382, 1976.
- CUTLIP, R. C.; LEHMKUKL, H. D.; SCHMERR, M. J. F.; BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. **Veterinary Microbiology**. v. 17, p. 237-250, 1988.
- DAHLBERG, J. E., GASKIN, J. M., PERK, K. Morphological and immunological comparasion of caprine arthritis encephalites and ovine progresses pneumonia viruses. **Journal Virology**. v. 39, n. 3, p. 914-919, 1981.

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

DAWSON, M. Maedi-Visna: a review. **Veterinary Record**. v. 106, p. 212-216.1980.

DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **Veterinary Record** . v. 120, p. 451-454, 1987.

DAL PIZZOL, M; RAVAZZOLO, A. P.; GONÇALVES, I. P. D.; HÖTZEL, I.; FERNANDES J.C.T.; MOOJEN, V. Maedi-Visna: evidência de ovinos infectados no Rio Grande do Sul, Brasil, 1987-1989. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**. v.17, p.65-76, 1989.

DE BOER, G. F. Zwoergerziekte virus, the causative agent for progressive interstitial pneumonia (maedi) and meningo-leucoencephalitis (visna) in sheep. **Research Veterinary Science**. v. 18, p. 15-25. 1975.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. de la; BRODIE, S. J.; MAGNUS-CORRAL, S.; BOWEN, R. A.; DeMARTINI, J. C. Pathologic and serologic responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirology**. v. 8, p. 116-123, 1995.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practice**. v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; MAGNUS-CORRAL, S.; BRODIE, S. J.; DeMARTINI, J. C. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. **American Journal Veterinary Research**. v. 57, p. 684-688, 1996.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**. v. 10, p. 251-262, 1993.

ELLIS, J. A.; DeMARTINI, J. C. Immunomorphologic and morphometric changes in pulmonary lymph nodes of sheep with progressive pneumonia. **Veterinary Pathology**. v. 22, p. 32-41, 1985.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. E. Retroviridae: The viruses and their replication. **Fields Virology**. Lippincott-Raven, 3<sup>a</sup> ed., v. 1, p. 1767-1847, 1996.

- FRASER, C. M. **Manual Merck de veterinária: um manual de diagnóstico, tratamento, prevenção e controle de doenças para o veterinário.** São Paulo: Roca, 1991.
- 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. **The Journal of Virology**, v. 58, n. 1, p. 67-74, 1986.
- GEORGSSON, G.; PÁLSSON, P. A. The histopathology of maedi. **Veterinary Pathology**. v.8, p. 63-80, 1971.
- GONDA, M. A. Molecular biology and virus-host interactions of lentiviruses. **Annals New York Academy Science**. v. 724, p. 22-42, 1994.
- GONDA, M. A.; BRAUM, M. J.; CLEMENTS, J. E.; PYPHER, J. M.; WONGSTAAL, F.; GALLO, R. C.; GILDEN, R. V. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. **Proceedings National Academy Science**. n. 83; p. 4007-4011, 1986.
- GONDA, M. A.; BRAUN, M. J.; CARTER, S. G. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. **Nature**. v. 330, p. 388-395, 1987.
- GONZALEZ, L.; GELABERT, J. L.; MARCO, J. C.; SAEZ-DE-OKARIZ, C. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. **Veterinary Record**. v. 120, p. 102-109, 1987.
- GONZALEZ-SANTANDER, R. **Técnicas de microscopia eletronica en biología**. 1<sup>a</sup> ed. Madrid: Aguilar. 1969, 665p.
- GORREL, M. D.; BRANDON, M. R.; SHEFFER, D.; ADAMS, R. J.; NARAYAN, O. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. **Journal of Virology**. v.66, n.5, p. 1679-1688, 1992.
- HAASE, T. A. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**. V. 322, p. 130-136, 1986.
- HARMACHE, A.; VITU, C.; RUSSO, P.; BOUYAC, M.; HIEBLOT, C.; PEVERI, P.; VIGNE, R.; SUZAN, M. The caprine arthritis-encephalitis virus tat gene is

dispensable for efficient viral replication *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Virology**. v. 69, n.9, p. 5445-5454, 1995.

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

HOUWERS, D. J.; GIELKENS, A. L. J.; JAN SCHAAKE Jr., J. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. **Veterinary Microbiology**. v. 7, p. 209-219, 1982.

HOUWERS, D. J.; KONIG, C. D.; DE BOER, G. F.; SCHAAKE, J. JR. Maedi-visna controle in sheep. I. Artificial rearing of colostrum-deprived lambs. **Veterinary Microbiology**. v. 8, n. 2, p. 179-185. 1985.

JAN, C. L., GREENLAND, T., GOUNEL, F., BALLEYDIERS, S., MORNEX, J. F. Activation of small ruminant aortic endothelial cells after *in vivo* infection by caprine arthritis encephalites virus. **Research Veterinary Science**, v. 69, n. 3, p. 225-231, 2000.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviruses. In: **Fields Virology**. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. P. 1977-1996, 1996.

JOLLY, P. E.; HUSO, D. L.; SHEFFER, D.; NARAYAN, O. Modulation of lentivirus replication by antibodies: Fc portion of immunoglobulin molecule is essential for enhancement of binding, internalization, and neutralization of Visna Virus in macrophages. **Journal of Virology**. v. 63, n. 4, p. 1811-1813, 1989.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole. 2000. p. 341.

KENNEDY-STOSKOPF, S.; NARAYAN, O. Neutralizing antibodies to visna lentivirus: mechanisms of action and possible role in virus persistence. **Journal of Virology**. v. 59, p. 37-44, 1986.

KLEIN, J. R.; MARTIN, J.; GRIFFING, S.; NATHANSON, N. Precipitating antibodies in experimental visna and natural progressive pneumonia of sheep. **Research Veterinary Science**. v. 38, p. 129-133, 1985.

KLEVJER-ANDERSON, P.; MCGUIRE, T. C. Neutralizing antibody response of rabbits and goats to caprine arthritis-encephalitis virus. **Infectious Immunology**. v. 38, p. 455-461, 1982.

KNOWLES Jr, D. P.; CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C.; STEM, T.; GORHAM, J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp 135 in chronic infection with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Virology**. v. 64, p. 2396-2398, 1990.

KNOWLES Jr., D. P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practices**. v. 13, p. 1-11, 1997.

KNOWLES, D. P.; EVERMANN, J. F.; SHROPSHIRE, C.; VANDERSCHALIE, J.; BRADWAY, D.; GEZON, H. M.; CHEEVERS, W. P. Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal Clinical Microbiology**. v. 32, p. 243-245, 1994.

LAIRMORE, M. D.; AKITA, G. Y.; RUSSELL, H.; DeMARTINI, J. C. Replication and cytopathic of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with in vivo pathogenicity. **Journal of Virology**. v. 12, n. 61, p. 4038-4042, 1987.

LAIRMORE, M. D.; POULSON, J. M.; ADUCCI, T. A.; DeMARTINI, J. C. Lentivirus-induced lymphoproliferative disease. Comparative pathogenicity of phenotypically distinct ovine lentivirus strains. **American Journal of Pathology**. v. 130, p. 80-90, 1988.

LEE, W. C.; McCONNEL, I., BLACKLAWS, B. A. Cytotoxic activity against maedi-visna virus – infected macrophages. **Journal Virology**, v. 68, p. 8331-8338, 1994.

LEE, W. C.; McCONNELL, I.; BLACKLAWS, B. A. Electron microscope studies of the replication of a British isolate of Maedi-Visna virus in macrophages and skin cell lines. **Veterinary Microbiology**. v. 43, p. 93-104, 1996.

LERONDELLE, C.; GODET, M.; MORNEX, J. F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**. v. 5, n. 30, p. 467-474, 1999.

- LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTANG, J.; LYON, M.; QUÉRAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R.; MORNEIX, J. F. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. **Archives Virology**. v. 140, p. 1-11, 1995a.
- LEROUX, C.; VUILLERMOZ, S.; MORNEIX, J. F.; GREENLAND, T. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentivirus obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. **Journal General of Virology**. v. 76, p. 1533-1537, 1995b.
- LICHTENSTEIGER, C. A.; CHEEVERS, W. P.; DAVIS, W. C. CD8+ cytotoxic T-lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis encephalitis virus. **Journal General of Virology**. v. 74, p. 2111-2116, 1993.
- LUJÁN, L.; BEGARA, I.; COLLIE, D. D. S.; WATT, N. J. Ovine lentivirus (Maedi-Visna Virus) protein expression in sheep alveolar macrophages. **Veterinary Pathology**. v. 31, p. 965-703, 1994.
- LUJÁN, L.; GARCCIA, J. F. M.; FERNÁNDEZ DE LUCO, D.; VARGAS, A.; BADIOLA, J. J. Pathological changes in lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection. **Veterinary Record**. v. 129, p. 51-54, 1991.
- LUNA, L. C. **Manual of histologic staining: Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3<sup>a</sup> ed. New York: McGraw, 1968. 258p.
- MACKENZIE, R. W.; OLIVER, R. E.; ROONEY, J. P. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 35, p. 184-186, 1987.
- MARCOM, K. A.; BRODIE, S. J.; PEARSON, L. D. Analysis of ovine lentivirus infectivity and replication using a focal immunoassay and an antigen-capture ELISA. **Journal Clinical Microbiology**. v. 30, p. 2852-2858, 1992.
- MARSH, H. Progressive Pneumonia in sheep. **Journal American Veterinary Medicine**. v. 62, p. 458-473. 1923.
- MILCZEWSKI, V.; SOTOMAIOR, C.; REISCHAK, D.; VON GROLL, A. Relato do primeiro isolamento do vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997. p. 179.

MITCHELL, D. T. Investigations into jaagziekte or chronic catarrhal pneumonia of sheep. Dir. Vet. Educ. Res., 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> Report, Union of South Africa, p. 585. 1915.

MOOJEN, V. **Maedi-Visna dos ovinos**. In: RIET-CORRÊA, F. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. Pelotas: Universitária, 1998.

MOOJEN, V. **Maedi-Visna dos ovinos**. In: RIET-CORRÊA, F. Doenças de Ruminantes e Eqüinos. São Paulo: Varela, 2001, v.1. 138-144.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**. v. 1, p. 77-78, 1986.

MORNEX, J. F.; LENA, P.; LOIRE, R.; COZON, G.; GREELAND, T.; GUIGEN, F.; JACQUIER, M. F.; CORDIER, G. Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. **Veterinary Research**. v. 25, n. 5, p. 478-488, 1994.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. **Virology**. v. 259, n. 1, p. 67-73, 1999.

NAKANE, P. K.; PIERCE Jr., G. B. Enzyme-labeled antibodies preparation and application for the localization of antigens. **Journal Histochemistry Cytochemistry**. v. 14, n. 12, 1967.

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

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Research Infectious Disease**. v. 7, p. 89-97, 1985.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **Journal General of Virology**, v. 50, n. 1, p. 69-79, 1980.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J. E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during

maturation of monocytes to macrophages. **Infectious Immunology**. v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.

NARAYAN, P.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J.; HESS, J. Lack of neutralizing antibodies to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Virology**. v. 49, p. 349-355, 1984.

NORMAN, S.; SMITH, M. C. Caprine arthritis encephalitis: review of the neurologic form in 30 cases. **Journal American Veterinary Medical Association**. v. 182, p. 1342-1345, 1983.

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2ª ed. Gráfica LCR, 199p. Fortaleza-CE, 1997.

OLIVEIRA, L. H. S. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. 368p.

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 Veterinary Research**. v. 42, p. 1554-1559, 1981.

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

PAWLISCH, R. A.; MAES, R. K. Caprine arthritis-encephalitis virus isolated from Michigan goats. **American Journal Veterinary Research**. v. 45, p. 1808-1811, 1984.

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

PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le CAEV revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. **Revue Médecine Vétérinaire**. v. 144, p. 93-98, 1993.

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, 2001. 115p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.

- PRESTON, B.; DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends Microbiology**, v. 4, p. 16-21, 1996.
- PREZIUSO, S.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; RENZONI, G.; BRACA, G. Experimental maedi visna virus infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. **European Journal of Histochemistry**. v. 47, n. 4, p. 373-378, 2003.
- PRITCHETT, R. F. Retroviridae. In: **Tratado de Microbiologia Veterinária**. Zaragoza. Espanha: Acribia, 1994, p. 637-658.
- QUÉRAT, G.; AUDOLY, G.; SONIGO, P.; VIGNE R. Nucleotide sequence analysis of SA-OMVV, a visna-related ovine lentivirus: phylogenetic history of lentiviruses. **Virology**. v. 175, p. 434-447, 1990.
- QUÉRAT, G.; BARBAN, V.; SAUZE, N.; FILIPI, P.; VIGNE, R.; RUSSO, P.; VITU, C. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct, **Journal of Virology** v. 52, p. 672-679, 1984.
- RAVAZZOLO, A. P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small animal lentiviruses from southern Brazil. **Virus Research** v. 79, p. 117-123, 2001.
- RAVAZZOLO, A. P.; MARCHESIN, D.; CALDAS, A. P.; VIEIRA, L. A.; MOOJEN, V.; QUÉRAT, G. Detection of brazilian isolates of visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. In: V Encontro de Virologia, 1995. p. B-15.
- REDDY, P. G.; SAPP, W. J.; HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **Journal Clinical Microbiology**. v.31, p. 3042-3043, 1993.
- REISCHAK, D.; RAVAZZOLO, A. P.; MOOJEN, V. Imunofluorescência utilizando isolados brasileiros no diagnóstico sorológico de infecção por lentivírus em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 22, n. 1, p. 7-12, 2002.
- REYBURN, T. H.; ROY, J. D.; BLACKLAWS, A. B.; SARGAN, R. D.; WATT, J. N.; McCONNELL, I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to maedi-visna virus. **Virology**. v. 191, p. 1009-1012, 1992.

- RIMSTAD, E.; EAST., N. E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DEROCK, E.; PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal Veterinary Research.** v. 54, p. 1858-1862, 1993.
- RIBEIRO L. A. Risco de introdução de doenças exóticas pela importação de ovinos. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico.** n. 13, p.39-44, 1993.
- ROBINSON, W. F.; ELLIS, T. M. The pathological features of na interstitial pneumonia of goat. **Journal Comparative Pathology.** v. 94, p. 55-64, 1984.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology.** 5<sup>a</sup> ed. London: Mosby, 1998. 423p.
- ROSATI, S.; KWANG, J.; TOLARI, F.; KEEN, J. E. A comparison of whole virus and recobinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. **Veterinary Research Communications.** v. 18, p. 73-80, 1994.
- ROWE, J. D.; EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Veterinary Clinical North American: Food Animal Practices.** v. 13, p. 34-53, 1997.
- RYAN, S.; TYLEY, L.; McCONNELL, J.; BLACKLAWS, B. Infection of dendritic cells by the maedi-visna lentivirus. **Journal of Virology.** v. 74, n. 21, p. 10096-10103, 2000.
- SANNA, E.; SANNA, M. P.; VITALI, C. G.; RENZONI, G.; SANNA, L.; SPANO, S.; ROSSI, G.; LEONI, A. Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal Comparative Pathology.** v. 121, n. 3, p. 271-276, 1999.
- SANTANA, A. F. Ovinocultura do Nordeste Brasileiro. [on line]. Disponível em: [www.geco.cjb.br/artigo](http://www.geco.cjb.br/artigo). Acessado em 20 de agosto de 2003.
- SCHADE, K. H. **Light Microscopy: technology and application.** 2<sup>a</sup> ed. Munchen: Verag moderne industrie, 1995, 70p.
- SIGURDARDÓTTIR, B.; THORMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with maedi. **Journal Infectious Disease.** v. 114, p. 55-60. 1964.

SIGURDSSON, B. Observations on three slow infections of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida a slow encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. **Brazilian Veterinary Journal**. v. 110, p. 255, 1954.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PALSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Archives Gesante Virusforsch.** v. 10, p. 368-381, 1960.

SILVA, J. B. A. **Levantamento sorológico pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) da lentivirose ovina em rebanhos do Rio Grande do Norte, Brasil.** Fortaleza, 2003. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de veterinária, Universidade estadual do Ceará.

SIMARD, C.; BRISCOE, M. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparation to conventional agar gel immunodifusion test. **Canadian Journal Veterinary Research**. v. 54, p. 451-456, 1990.

SMALL, J. A.; BIEBERICH, C.; GHOTBI, Z.; HESS, J.; SCANGOS, G. A.; CLEMENTS, J. E. The visna virus long terminal repeat directs expression of a reporter gene in activated macrophages, lymphocytes, and the central nervous systems of transgenic mice. **Journal of Virology**. v. 63, n.5, p. 1891-1896, 1989.

SOTOMAIOR, C.; MILCZEWSKI, V. Relato de um rebanho ovino infectado pelo vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 1997. p. 179.

SPIEGEL, M. R. **Estatística**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1985, 249-271.

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

STRAUB, O. C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. v. 27, p. 1-5, 2004.

TEIXEIRA, M. F. S.; VERONIQUE, L.; MSELLI-LAKAHL, L.; CHETTAB, A.; CHEBLOUNE, Y.; MORNEX, J. F. Immortalization of caprine fibroblasts permissive

- for replication of small ruminant lentiviruses. **American Journal Veterinary Research**. v. 56, n. 6, p. 579-584, 1997.
- THORMAR, H.; HELGADOTTIR, H. A comparison of visna and maedi viruses. II. Serological relationship. **Research Veterinary Science**. v. 6, p. 456-465. 1965.
- THORMAR, H. A comparison of visna and maedi viruses. I. Physical, chemical and biological properties. **Research Veterinary Science**. v. 6, p. 117-129. 1965.
- TIZARD, I. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 5<sup>a</sup> ed., São Paulo:Roca, 1998, 545 p.
- TIZARD, I. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo:Roca, 1985, 330 p.
- VAREA, R.; MONLEON, E.; PACHECO, C.; LUJAN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; VAN EYNDE, G.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 13, p. 301-307, 2001.
- VASCONCELOS, A. C. **Necropsia e remessa de material para laboratório em medicina veterinária**. Brasília: MEC, 1988.
- VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. **A evolução da caprino-ovinocultura brasileira** [online]. Disponível em: [www.cnpc.embrapa.br/artigos](http://www.cnpc.embrapa.br/artigos). Acessado em 30/08/2003
- VERWOERD, D. W.; PAYNE, A. L.; YORK, D. F.; MYER, M. S. Isolation and preliminar characterization of the Jaagsiekte retrovirus (JSRV). Onderstepoort. **Journal Veterinary Research**. v. 50, p. 309-316, 1983.
- WAGTER, L. H. A.; JANSEN, A.; BLEUMINK-PLUYM, J. A.; LENSTRA, J. A.; HOUWERS, D. J. PCR detection of lentiviral gag segment DNA in the white blood cells of sheep and goats. **Veterinary Research Communication**. v. 22, p. 355-362, 1998.
- ZANONI, R. G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. **Journal General of Virology**. v. 79, p. 1951-1961, 1998.
- ZANONI, R.; PAULI, L. T.; PETERHANS, E. Detection of caprine arthritis-encephalitis and maedi-visna viruses using polymerase chain reaction. **Experientia**. v.46, p. 316-319, 1990.

ZINK, M. C.; JOHNSON, L. K. Pathobiology of lentivirus infections of sheep and goats. **Virus Research**. v. 32, p. 139-154, 1994.

ZINK, M. C.; NARAYAN, O.; KENNEDY, P. G. E. Pathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 15, p. 167-180, 1987.

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. **American Journal Pathology**. v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.

## **Artigo**

**Estudo histológico de pulmões de ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna.**

**Enviado para publicação:** Arquivos do Instituto Biológico

## **Estudo histológico de pulmões de ovinos sorologicamente positivos para Maedi-Visna.**

Araújo, S. A. C.<sup>1</sup>; Dantas, T. V. M.<sup>1</sup>; Silva, J. B. A.<sup>1</sup>; Ribeiro, A. L.<sup>1</sup>; Ricarte, A. R. F.<sup>1</sup>;  
Almeida, N. C.<sup>1</sup>; Riet-Correa-, F.<sup>2</sup>; Teixeira, M. F. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Ceará. Faculdade de Veterinária, Laboratório de Virologia. Avenida Paranjana 1700. Campus do Itaperi. Fortaleza-Ceará. CEP: 60740-000. Fone: 0xx8532992749. E-mail: [suzana\\_arauj@yahoo.com.br](mailto:suzana_arauj@yahoo.com.br)

### **Resumo**

Maedi-Visna é uma doença crônica e progressiva de ovinos. O agente etiológico Maedi-Visna Vírus (MVV) é um lentivírus pertencente à família Retroviridae. As maiores manifestações da inflamação induzida pelo MVV são perda progressiva de peso, pneumonia intersticial, encefalite, mastite, artrite e linfadenopatia. Com o objetivo de identificar anticorpos e lesões pulmonares sugestivas da Maedi-Visna foram coletadas amostras de sangue e fragmentos pulmonares de 223 ovinos provenientes de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza. Os soros foram submetidos ao teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) utilizando-se um kit diagnóstico para Maedi-Visna fornecido pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Constatou-se que 11 amostras (5%) dos animais amostrados apresentavam-se positivos para o teste de IDGA. Os fragmentos pulmonares dos animais soropositivos e igual número de animais soronegativos foram estudados histologicamente. Não foram encontradas lesões macroscópicas e histológicas características de Maedi-Visna tanto nos animais soropositivos quanto nos soronegativos. Esses resultados confirmam a ocorrência de infecções subclínicas por MVV, sem lesões macroscópicas ou histológicas, e evidenciam a necessidade de um diagnóstico sistemático das afecções respiratórias, da glândula mamária, das articulações e do sistema nervoso central de ovinos para determinar a importância de Maedi-Visna para a ovinocultura em diferentes regiões do País .

**Palavras-chave:** Lentivírus, Maedi-Visna, histopatologia, infecções subclínicas,.

### **Abstract**

Maedi-Visna (MV) is a chronic and progressive disease of sheep. The etiologic agent- Maedi-Visna Virus (MVV)- is a lentivirus belonging to the Retroviridae family. The main manifestations of MV are progressive weight loss, interstitial pneumonia, encephalomyelitis, mastitis, arthritis, and lymphadenopathy. With the objective of identify lung lesions on sheep with antibodies against MVV samples of blood and lung fragments of 223 coming sheep were collected in slaughterhouses of the metropolitan area of Fortaleza, State of Ceará, Brazil. The serum samples were submitted to the agar-gel immunodiffusion test (AGIDT) using a kit diagnosis for MV supplied by the Federal Rural University of Pernambuco. Eleven (5%) of the serum samples were positive for antibodies to MVV. The lung samples of the positive sheep and 11 lung samples from the negative sheep were studied histologically. No lesions characteristic of MV were observed macroscopically or histologically in sheep with and without antibodies. These results confirmed the occurrence of subclinical MVV infections without gross or histological lesions. The systematic diagnosis of diseases of the respiratory and central nervous systems, joints and mammary gland in sheep should contribute the knowledge of the importance of MV for sheep in the different Brazilian regions.

**Key words:** Lentiviruses, histopathology, Maedi-Visna, subclinical infections.

## **Introdução**

Maedi-Visna é uma doença progressiva e crônica de ovinos descrita por Sigurdsson *et al.*, (1954) na Islândia e presente em todo o mundo com exceção da Austrália e Nova Zelândia (Brodie *et al.*, 1998). O agente etiológico Maedi-Visna Vírus (MVV) é um Lentivírus pertencente a família Retroviridae. Este relaciona-se antigenicamente com o vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV). A Maedi-Visna e a CAE são denominadas de Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR) (Moojen, 2001).

A doença é caracterizada por um longo período de incubação, uma inflamação linfoproliferativa progressiva, e um lento desenvolvimento dos sintomas (Pepin *et al.*, 1998). Os principais órgãos alvo relatados são os pulmões (Sigurdsson *et al.*, 1952) e o sistema nervoso central (Sigurdsson *et al.*, 1957), no entanto o úbere e as articulações também podem ser afetados (Cutlip *et al.*, 1985a e 1985b). O vírus infecta células da linhagem monócito-macrófago, porém o RNA vírico tem sido identificado também em outros tipos celulares (Brodie *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 2000).

Além do MVV as Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR) incluem o Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), sendo sugerido a possibilidade de transmissão de LVPR de caprinos para ovinos e vice-versa, como já foi demonstrado experimentalmente, podendo ocorrer a recombinação entre amostras ovinas e caprinas cujas conseqüências são desconhecidas (Callado *et al.*, 2001). Além disso, a alta variabilidade genômica do vírus tem contribuído para a origem de muitas cepas virais com diferente patogenicidade (De la Concha-Bermejillo, 1997); por esta razão, as manifestações clínicas e patológicas da infecção pelo MVV em áreas geográficas diferentes podem ser variáveis.

No Brasil a presença de ovinos infectados pelo MVV foi registrada primeiramente por Moojen *et al.*, (1986). Durante muitos anos o semi-árido nordestino foi considerado livre desta enfermidade, talvez pela inexistência de dados que confirmassem a sua ocorrência. No entanto, nos últimos anos algumas pesquisas vieram confirmar ocorrência de anticorpos em alguns estados nordestinos como Ceará (Almeida, 2003) e Rio Grande do Norte (Silva, 2003), onde a sorologia positiva de um número significativo de ovinos indicam que há necessidade de estudos da relação entre a presença de anticorpos e a ocorrência das diferentes formas clínicas doença, tanto na sua forma clínica quanto das alterações patológicas.

O objetivo deste estudo foi identificar lesões pulmonares em ovinos sorologicamente positivos para LVPR.

## **Material e Métodos**

### **Amostras**

Foram coletadas 223 amostras de soro e fragmentos pulmonares de animais da espécie ovina, dos quais 72 eram machos e 145 fêmeas, SRD, com idade entre 1 e 5 anos, provenientes de abatedouros da região metropolitana de Fortaleza. As amostras de sangue ovino foram coletadas por venopunção jugular utilizando-se tubos vancouver descartáveis não-heparinizados, os quais eram acondicionados em caixa de material isotérmico, contendo gelo, e remetidas ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará para centrifugação e obtenção do soro, sendo este aliqotado em eppendorf, congelados e mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Durante o abate os pulmões eram avaliados macroscopicamente quanto a coloração, textura e consistência.

### **Sorologia**

A sorologia para infecção pelo Maedi-Visna Vírus foi realizada pelo método de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), adquirido na Universidade Federal Rural do Pernambuco, que consiste na detecção de linhas de precipitação nos casos positivos, decorrentes da reação antígeno-anticorpo.

### **Histopatologia**

Foram retirados fragmentos de 2 x 2 cm em cortes transversais e longitudinais em seguida fixados em formalina a 10%, neutra e tamponada. Foram analisadas histopatologicamente as amostras pulmonares dos animais que reagiram como sorologicamente positivos. O grupo controle negativo consistiu no mesmo número de amostras soropositivas, cujos pulmões foram devidamente processados. Os fragmentos pulmonares foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para obtenção de cortes seriados à espessura de  $5\mu\text{m}$  e corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE), segundo Luna (1968) e examinadas ao microscópio óptico.

### **Análise Estatística**

A prevalência por sexo foi submetida ao teste não-paramétrico qui-quadrado ( $\chi^2$ ) adotando-se o nível de significância igual a cinco por cento, conforme recomendado por Spiegel, (1985).

## Resultados e Discussão

A análise sorológica para infecção pelo MVV, realizada através do teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA), nos 223 ovinos testados revelou um percentual de 4,93% (n=11) de animais soropositivos para a infecção pelo MVV, sendo 6 (8,33%) machos de um total de 72 e 5 (3,45%) fêmeas de um total de 145, não havendo diferença significativa entre os sexos. Esta prevalência foi inferior a encontrada por Almeida *et al.*, (1999) de 31,67% em ovinos abatidos na região metropolitana de Fortaleza-CE, que apresentavam lesões macroscópicas de pneumonia e artrite. Por outro lado Silva (2003), em levantamento sorológico realizado, em ovinos criados de forma extensiva, no Estado do Rio Grande do Norte encontrou uma prevalência de 21,3% de animais soropositivos. A diferença entre os resultados encontrados pode ser justificada pela procedência dos animais amostrados, uma vez que os utilizados no presente trabalho eram ovinos sem lesões pulmonares ou articulares provenientes de abatedouros, ao contrário do resulta obtido por Almeida *et al.*, (1999) em animais com lesões. As diferenças da prevalência observadas por Silva (2003) pode ser devida a idade dos animais amostrados, uma vez que dos 223 amostrados, 221 não tinham completado a dentição (<4 anos), enquanto que as amostras analisadas por Silva (2003) foram coletadas nas fazendas incluindo animais adultos. Desta forma como a Maedi-Visna é caracterizada por ser crônica, devido ao seu longo período de incubação (Pepin *et al.*, 1998) a mesma tem uma maior prevalência em animais na idade adulta (Arsenault *et al.*, 2003). No Rio Grande do Sul em um levantamento realizado em 16 municípios do Estado foi encontrado uma prevalência de 10,48%. de animais soropositivos (Dal Pizzol *et al.*, 1989). Em outro trabalho no mesmo Estado foi encontrado uma prevalência de 19%. (Ribeiro, 1993). Ambos os levantamentos foram realizados em fazendas com histórico de importação de ovinos.

Outro fator que pode influir na detecção de animais soropositivos é o antígeno utilizado, sendo que os antígenos específicos produzido com MVV apresentam uma sensibilidade 35% maior que os antígenos heterólogos, como o produzido com o CAEV (Knowles 1997). Neste trabalho foi utilizado um antígeno específico p28. No entanto Adams & Gorham (1986) relatam que a gp 135 confere maior sensibilidade à técnica de IDGA que a p28.

Não foram encontradas lesões macroscópicas semelhantes às observadas em Maedi-Visna nos pulmões dos animais abatidos. Na Maedi-Visna observam-se aderências pleurais, pulmões pesados e firmes à palpação e áreas múltiplas de coloração róseo-acizentadas (Robinson & Ellis 1984, Narayan & Cork 1985, Cutlip *et al.*, 1988). Além disso, os pulmões não colapsam quando o tórax é aberto. Esses órgãos têm uma consistência densa, mas não

parecem estar consolidados. As lesões podem ser encontradas em todos os lobos pulmonares. Os pulmões estão distendidos, parecem aumentados, e pesam duas a cinco vezes mais que os pulmões normais dos ovinos, normalmente de 300 a 500g. (Jones *et al.*, 2000).

Também não foram encontradas lesões histológicas características de MV nos pulmões dos animais soropositivos e nem do grupo controle. Foram observadas, ocasionalmente, infiltração linfocitária multifocal de localização preferencial peribronquial e perivascular, áreas de espessamento do septo alveolar com ocasional infiltração linfocitária e áreas de atelectasia e enfizema. As alterações histológicas da MV caracterizam-se por pneumonia intersticial crônica com espessamento frequentemente fibrótico do septo intralveolar, Há hiperplasia linfóide perivascular e peribronquial, e hipertrofia do músculo liso (Fraser, 1991).

Os resultados deste trabalho confirmam que infecções por MVV podem ocorrer sem sinais clínicos aparentes e lesões macroscópicas ou histológicas nos ovinos dos rebanhos afetados. No Brasil não foi determinado se estas manifestações subclínicas são causadas por LVPR do tipo I grupo MVV ou do tipo II grupo CAEV. A presença de anticorpos contra LVPR em ovinos foi detectada no Rio Grande do Sul (Dal Pizzol *et al.*, 1989, Ribeiro, 1993), Ceará (Almeida, 1999) e Rio Grande do Norte (Silva, 2003) e o vírus foi isolado no Paraná (Milczewski *et al.*, 1997) e Ceará (Almeida, 2003). O vírus isolado do Paraná, de um ovino com mastite e artrite foi identificado filogeneticamente como pertencente ao prototipo Maedi-Visna (Ravazolo *et al.*, 2001), enquanto que o vírus isolado no Ceará, proveniente de um ovino com lesões pulmonares de Maedi-Visna (Almeida, 2003) não foi estudado filogeneticamente. Por outro lado, amostras de LVPR isoladas de caprinos no Brasil demonstraram ser filogeneticamente pertencentes ao grupo Maedi-Visna, sugerindo a ocorrência de transmissão de LVPR de caprinos para ovinos e vice-versa e a possibilidade de recombinação entre amostras ovinas e caprinas (Castro *et al.*, 1999). Esses resultados demonstram que, no Brasil, apesar da presença de anticorpos para MV, os sinais clínicos e a patologia da doença tem sido raramente observadas. O diagnóstico sistemático das afeções respiratórias, das articulações, da glândula mamária e do sistema nervoso central de ovinos é necessário para determinar a importância de MV para a ovinocultura em diferentes regiões do País.

## **Conclusões**

A avaliação dos resultados da identificação do Maedi-Visna Vírus em pulmão de ovinos naturalmente infectados, nos permite chegar as seguintes conclusões:

1. A prevalência de infecção por Maedi-Visna nas amostras pesquisadas foi de 5%.
2. O sexo não influenciou na prevalência da infecção pelo MVV.
3. Não ocorreram lesões macroscópicas e histopatológicas características de Maedi-Visna nos animais sorologicamente positivos.

### Referências Bibliográficas

- ABREU, S. R. O.; CASTRO, R. S.; NASCIMENTO, S. A. produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite encefalite caprina e comparação com o vírus maedi-visna para imunodifusão em ágar-gel. *Pesq. Vet. Bras.* v. 18, n. 2, p. 57-60, 1998.
- ADAMS, D. S.; GORHAM, J. R. The gp 135 of caprine arthritis encephalitis virus affords greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.* v. 40, p. 157-160, 1986.
- ALMEIDA, N. C. *Isolamento e identificação do vírus Maedi-Visna através de microscopia eletrônica de transmissão de animal comprovadamente soropositivo pelo IDGA*. Fortaleza, 2003. 68p. [Dissertação – Faculdade de veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza].
- ALMEIDA, N. C.; APRÍGIO, C. J. L. ; FERREIRA, R. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Levantamento sorológico de lentivírus ovino em animais destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. IV Semana Universitária da Universidade Estadual do Ceará, 1999.
- ARSENAULT, J.; GIRARD, C.; DUBREUIL, P.; DAIGNAULT, D.; GALARNEAU, J.; BOISCLAIR, J.; SIMARD, C.; BÉLANGER, D. Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna, paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.* v. 59, p. 67-81, 2003.
- BAUMGARTNER, W.; RECKINGER, M.; PERNTHANER, A.; LEITOLD, B. The occurrence and distribution of maedi-visna virus in lower Austrian sheep breeding establishments. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* v. 97, n. 11, p. 465-469, 1990.
- BLACKLAWS, B. A.; BIRD, P.; ALLEN, D.; McCONNELL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus-infected sheep. *J. Gen. Virol.* v. 75, p. 1589-1596, 1994.
- BRODIE, S. J. 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. *Am. J. Pathol.* v. 146, p. 250-263, 1995.
- BRODIE, S. J.; CONCHA-BERMEJILLO, A.; SNOWDER, G. D. 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.
- CAPUCCHIO, M. T.; SANNA, E.; SANNA, M. P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedi-Visna Virus detection in ovine third eyelids. *J. Comp. Pathol.* v. 129, p. 37-43, 2003.

CARROZZA, M. L.; MAZZEI, M.; BANDECCHI, P.; ARISPICI, M.; TOLARI, F. In situ PCR-associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the Maedi-Visna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *J. Virol. Methods*. v. 107, p. 121-127, 2003.

CUTLIP, R. C.; JACKSON, T. A.; LEHMKUHL, H. D. Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *Am. J. Vet. Res.* v. 40, n.10, p. 1370-1374, 1980.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; BROGDEN, K. A.; BOLIN, S. R. Mastitis associated with ovine progressive pneumonia virus infection in sheep. *Am. J. Vet. Res.* v. 46, p. 326-328, 1985a.

CUTLIP, R. C.; LEHMKUHL, H. D.; WOOD, R. L.; BROGDEN, K. A. Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* v. 46, p. 65-68, 1985b.

DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A. Maedi-Visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* v. 13, n. 1, p. 13-33, 1997.

DAL PIZZOL, M.; RAVAZZOLO, A. P.; GONÇALVES, I. P. D.; HÖTZEL, I.; FERNANDES J.C.T.; MOOJEN, V. Maedi-Visna: evidência de ovinos infectados no Rio Grande do Sul, Brasil, 1987-1989. *Arq. Fac. Vet., UFRGS*. v.17, p.65-76, 1989.

GUEDES, M. I. M. C.; SOUZA, J. C. A.; GOUVEIA, A. M. G. Infecção experimental em cabritos pelo vírus da artrite encefalite. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 53, n.1, p. 1-7, 2001.

HAASE, A. T. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature*. v. 322, p. 130-136, 1986.

KNOWLES Jr., D. P. Laboratory diagnostic tests for Retrovirus infections of small ruminants. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.* v. 13, p. 1-11, 1997.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. 6<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole. 2000. p. 341.

LUJÁN, L.; GARCCIA, J. F. M.; FERNÁNDEZ DE LUCO, D.; VARGAS, A.; BADIOLA, J. J. Pathological changes in lungs and mammary glands of sheep na their relationship with maedi-visna infection. *Vet. Rec.* v. 129, p. 51-54, 1991.

LUNA, L. C. *Manual of histologic staining: Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3<sup>a</sup> ed. New York: McGraw, 1968. 258p.

MOOJEN, V.; SOARES, H. C.; RAVAZZOLO, A. P.; PIZZOL, M.; GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi/Visna - Artrite Encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet., UFRGS*. v. 1, p. 77-78, 1986.

MOOJEN, V. *Maedi-Visna dos ovinos*. In: RIET-CORRÊA, F. Doenças de Ruminantes e Equinos. São Paulo: Varela, 2001, v.1. 138-144.

MORNEX, J. F.; LENA, P.; LOIRE, R.; COZON, G.; GREELAND, T.; GUIGEN, F.; JACQUIER, M. F.; CORDIER, G. Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. *Vet. Res.* v. 25, n. 5, p. 478-488, 1994.

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. *Am. J. Vet. Res.* v. 42, p. 1554-1559, 1981.

PEPIN, M.; VITU, C.; RUSSO, P.; MORNEX, J. P.; PETERHANS, E. Maedi-Visna Virus infections in sheep: a review. *Vet. Res.* v. 29; p. 341-367, 1998.

PEREIRA, M. F. *Artrite-encefalite caprina a vírus (CAE)- estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas*. Belo Horizonte: 1995. 64p. [Dissertação – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais].

PREZIUSO, S.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; RENZONI, G.; BRACA, G. Experimental maedi visna virus infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Europ. J. Histochem.* v. 47, n. 4, p. 373-378, 2003.

PREZIUSO, S.; TACCINI, E.; ROSSI, G.; RENZONI, G.; BRACA, G. Experimental maedi visna virus infection in sheep: a morphological, immunohistochemical and PCR study after three years of infection. *Europ. J. Histochem.* v. 47, n. 4, p. 373-378, 2003.

RAVAZZOLO, A. P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Phylogenetic analysis of small animal lentiviruses from southern Brazil. *Virus Research.* v. 79, p. 117-123, 2001.

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

RYAN, S.; TYLEY, L.; McCONNELL, J.; BLACKLAWS, B. Infection of dendritic cells by the maedi-visna lentivirus. *J. Virol.* v. 74, n. 21, p. 10096-10103, 2000.

SCHALLER, P.; VOGT, H. R.; STRASSER, M.; NETTLETON, P. F.; PETERHANS, E.; ZANONI, R. Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. *Schweiz Arch Tierherilkd*, v. 142, n. 4, p. 145-153, 2000.

SERAKIDES, R.; NUNES, V. A.; PEREIRA, M. F. Estudo clínico, anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAE). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 48, n. 4, p. 415-424, 1996.

SIGURDSSON, B. Observations on three slow infections of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida a slow encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Braz. Vet. J.* v. 110, p. 255, 1954.

- SIGURDSSON, B.; GRIMSSON, H.; PALSSON, P. A. Maedi: A chronic progressive infection of sheep lungs. *J. Infec. Dis.* v. 90, p. 233-241, 1952.
- SIGURDSSON, B.; PALSSON, P. A.; GRIMSSON, H. Visna: A demyelinating transmissible disease of sheep. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* v.16, p. 389-403, 1957.
- SILVA, J. B. A. *Levantamento sorológico pelo teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) da lentivirose ovina em rebanhos do Rio Grande do Norte, Brasil.* Fortaleza: 2003. 58p. [Dissertação – Faculdade de Veterinária, Universidade estadual do Ceará, Fortaleza].
- SIMARD, C.; MORLEY, R. S. Seroprevalence of maedi-visna in Canadian sheep. *Can. J. Vet. Res.* v. 55, n. 3, p. 269-272, 1991
- SPIEGEL, M. R. *Estatística.* 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1985, 249-271.
- STORSET, A. K.; EVENSEN, O.; RIMSTAD, E. Immunohistochemical identification of caprine arthritis-encephalitis virus in paraffin-embedded specimens from naturally infected goats. *Vet. Pathol.* v. 34, p. 180-188, 1997.
- VALNES, K.; BRANDTZAEG, P.; ROGNUM, T. O. Sensitivity and efficiency of four immunohistochemical methods as defined by staining of artificial sections. *Histochemistry.* v. 81, p. 313-319, 1984.
- VASCONCELOS, V. R.; VIEIRA, L. S. *A evolução da caprino-ovinocultura brasileira* [online]. Disponível em: [www.cnpc.embrapa.br/artigos](http://www.cnpc.embrapa.br/artigos). Acessado em 30 de agosto de 2003.

# **ANEXO**

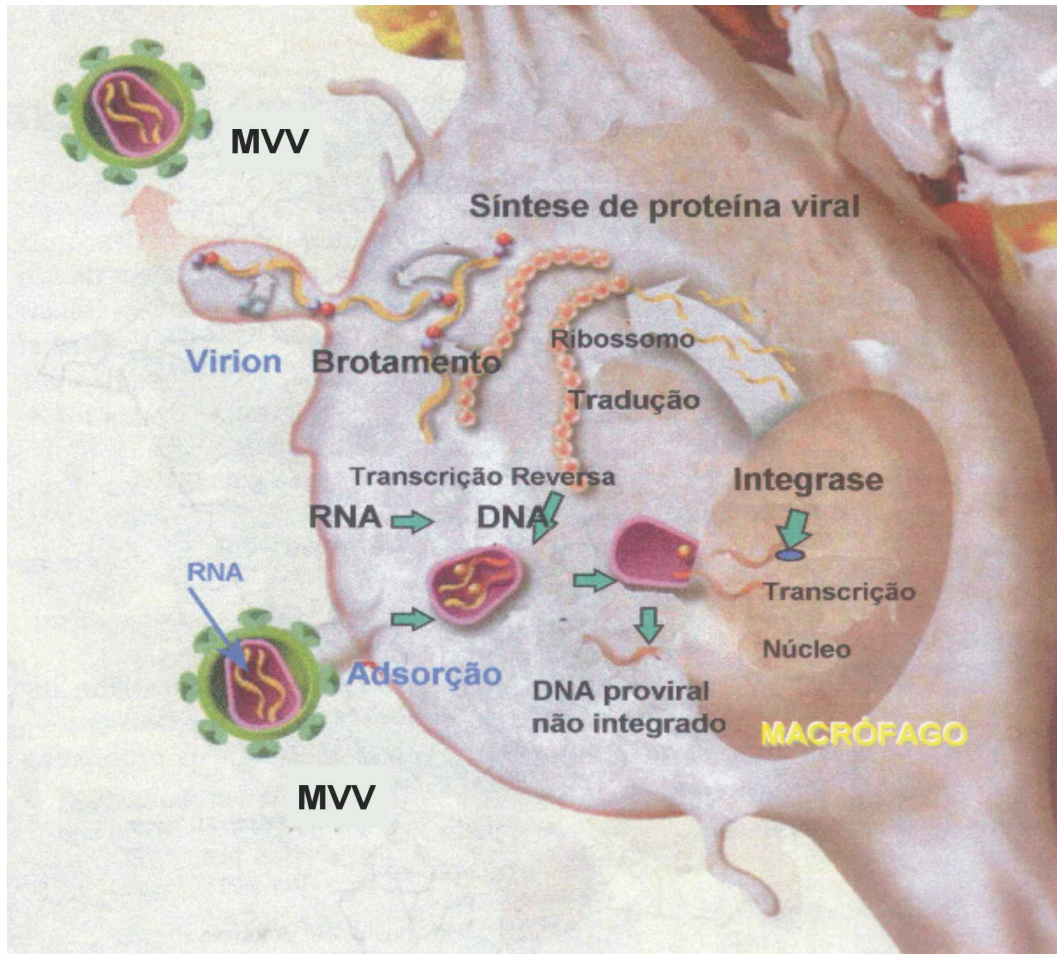


Figura 03 – Ciclo de replicação do lentivírus (Coffin, 1996).