



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANA KARINA CUNHA CALLADO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA INFECÇÃO POR
LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES**

RECIFE

2004

ANA KARINA CUNHA CALLADO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA INFECÇÃO POR
LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES**

Tese de doutoramento apresentada ao
Doutorado em Ciências Biológicas do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas, Área de Concentração:
Bioquímica.

ORIENTADORA:

VERA LÚCIA DE MENEZES LIMA, B. S., M. Sc., Ph D.

CO-ORIENTADOR:

ROBERTO SOARES DE CASTRO, M. Sc., Ph D.

RECIFE

MARÇO DE 2004

Callado, Ana Karina Cunha

Avaliação *in vitro* e *in vivo* da infecção por Lentivírus de pequenos ruminantes / Ana Karina Cunha Callado. – Recife : O Autor, 2004.

xxi , 122 folhas : il., fig., tab., gráf., fotos, mapa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2004.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Virologia – Replicação viral. 2. Lentivírus CAEV e Maedi-visna – Estudo soro-epidemiológico. 3. Caprinos – Animais infectados – Perfil lipídico. I. Título.

578.828

CDU (2.ed.)

UFPE

576.6484

CDD (20.ed.)

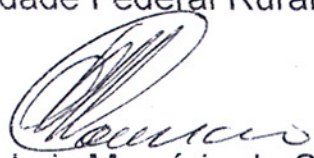
BC2004-443

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA INFECÇÃO POR LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES

ANA KARINA CUNHA CALLADO

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Roberto Soares de Castro
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife


Prof. Dr. Luis Maurício da Silva
Universidade Federal de Pernambuco - Recife


Profa. Dra. Luana Cassandra Breitentach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco - Recife


Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco - Recife


Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco - Recife

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido-me o dom da vida e o privilégio de realizar este trabalho, amparando-me e orientando-me em todos os momentos de minha vida pessoal e profissional.

A Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, professora e orientadora, por sua dedicação, empenho e ensinamentos.

Ao Dr. Roberto Soares de Castro, pela co-orientação e pelo imensurável auxílio na realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos, e muito mais que amigos... Lúcia Sadea Pereira da Costa de Arruda Falcão e Moacir Couceiro de Arruda Falcão, pela amizade, presença constante, auxílio e incentivo

À Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas.

A todos os professores do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas que contribuíram para a minha formação na pós-graduação.

A todos que fazem parte do Laboratório de Virologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela atenção e dedicação dispensadas na execução dos trabalhos, especialmente ao amigo Sérgio Alves do Nascimento.

A todos que fazem parte do Laboratório de Lipoproteínas do Departamento de Bioquímica que me auxiliaram na realização deste trabalho, em especial Amanda Soares Vasconcelos.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, especialmente, Dra. Diana Sione Barbosa Pinheiro, Dr. Cid Aristóteles de Siqueira Alencar, Dra. Dalila Angélica Moliterno Duarte e Dra. Maria do Rosário Oliveira da Cunha Beltrão.

A todos os colegas do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas pelos novos laços de amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro ao trabalho.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram a realizar este trabalho.

A meus pais,
que proporcionaram
meu desenvolvimento
pessoal e profissional.

A Dudu,
meu namorado,
com seu precioso
auxílio, companheirismo
e amor.

Toinho e Aldo,
meus irmãos,
que me incentivaram
e apoiaram

Dedico

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	–	Microlitro
AIDS	–	Síndrome da imunodeficiência humana
CAE	–	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	–	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
cDNA	–	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CL	–	Colesterol Livre
CT	–	Colesterol Total
DL	–	Dente de leite
DO	–	Densidade ótica
DNA	–	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	–	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	–	Ensaio de ligação de enzima
Fc	–	Fração que cristaliza
g	–	Gravidade
h	–	Hora
HDL	–	Lipoproteína de alta densidade
HIV	–	Vírus da imunodeficiência humana
IDGA	–	Imunodifusão em gel de agar
IFN	–	Interferon
IL	–	Interleucina
Kda	–	Quilodaltons
LCAT	–	Lecitina Colesterol Aciltransferase
LDL	–	Lipoproteína de baixa densidade
Log	–	Logarítimo
LTR	–	Terminal longo repetido
MHC	–	Complexo de Histocompatibilidade Maior
min	–	Minutos
mL	–	Mililitro
MS	–	Membrana sinovial

MSC	–	Membrana sinovial caprina
MSO	–	Membrana sinovial ovina
OPD	–	O-fenilfenilemediamina diidrochloride
ORF	–	Fase aberta de leitura
p	–	Probabilidade
PBS	–	Tampão salina fosfato
PEG	–	Polietileno glicol
PMSF	–	Fenilmetisulfonil Flourida
RNA _m	–	Ácido Ribonucléico Mensageiro
SNC	–	Sistema Nervoso Central
SRLV	–	Lentivirus de Pequenos Ruminantes
TCID ₅₀	–	50 % da dose Infectante para Cultivo de Tecido
TNF	–	Fator de necrose tumoral
UFPE	–	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	–	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VLDL	–	Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	xvi
ABSTRACT	xix
PALAVRAS-CHAVE	xxi
INTRODUÇÃO	
1. – Introdução	2
1.1. – Histórico	4
1.2. – Aspectos gerais	5
1.2.1. - Estrutura da partícula lentiviral	5
1.2.2. – Replicação	6
1.2.3. – Propriedades	8
1.2.4. – Epidemiologia	9
1.3. – Aspectos clínicos e anátomo-histopatológico	10
1.3.1. – Patogênese	10
1.3.2. – Formas de apresentação	12
1.3.3. – Lentivirose x Perfil lipídico	15
1.4. – Diagnóstico	17
1.5. – Estudo de amostras brasileiras de SRLV	19

OBJETIVOS

2. – Objetivos	23
----------------	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. – Referências bibliográficas	25
---------------------------------	----

RESULTADOS

4. – Resultados	55
4.1. – Capítulo 1 – Reaproveitamento de explantes de membrana sinovial caprina na cultura primária de células destinada à pesquisa de lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV).	55
4.2. – Capítulo 2 – Avaliação da replicação de amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes em cultura de células de membrana sinovial.	55
4.3. – Capítulo 3 – Levantamento soropidemiológico de lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos do Estado de Pernambuco.	56
4.4 – Capítulo 4 – Influence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) on lipids profile from serum of goats naturally infected.	56

CAPÍTULO 1 – Reaproveitamento de explantes de membrana sinovial caprina na cultura primária de células destinada à pesquisa de lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV).	58
CAPÍTULO 2 – Avaliação da replicação de amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes em cultura de células de membrana sinovial.	67
CAPÍTULO 3 – Levantamento soropidemiológico de lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos do Estado de Pernambuco.	89
CAPÍTULO 4 – Influence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) on lipids profile from serum of goats naturally infected.	107
 CONCLUSÕES	
5. – Conclusões	120
 ANEXOS	
6. – Anexos	122

RESUMO

RESUMO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) causam doença progressiva multissistêmica crônica, com longo período de incubação, que acomete caprinos e ovinos de todas as raças e idades. Estes vírus podem se manifestar de forma artrítica, respiratória, mamária e nervosa ou mesmo atingir vários órgãos, causando perda de peso e debilidade até a morte do animal. A infecção é persistente apesar da maioria dos animais infectados não desenvolver sintomas clínicos, com risco de disseminar o vírus para outros animais. A principal forma de transmissão do vírus do vírus é através da ingestão de colostro e/ou leite proveniente de animais infectados. Pode ocorrer transmissão horizontal. Os SRLV infectam células do sistema fagocítico-mononuclear e células dendríticas in vivo e infectam e replicam em macrófagos e em células derivadas de vários tecidos in vitro. O cultivo primário de células de membrana sinovial (MS) é amplamente utilizado para isolamento e replicação de SRLV. A capacidade de divisão destas células é limitada até atingir seu estado de senescência celular.

Objetivando a otimização da produção, foi celular feito o reaproveitamento de explantes das articulações metacarpianas de feto caprino soronegativos para SRLV. Os explantes foram reaproveitados por seis vezes. As células de MS obtidas mantiveram-se em níveis satisfatórios de produtividade e permissividade à replicação de amostras de SRLV. Estas células de MS foram utilizadas para estudo da replicação de amostras brasileiras de SRLV BrPe1-01 e BrMg2-03, de forma comparativa com as amostras padrão CAEV Cork e Maedi-visna K1514. Não se obtiveram títulos viral e antígeno significativos das amostras brasileiras nas várias tentativas de replicação das amostras BrPe1-01 e BrMg2-03.

Visando um melhor entendimento da epidemiologia dos SRLV em caprinos do Estado de Pernambuco, foi feito um levantamento sorológico nos anos de 2002 e 2003. Foram testados, por técnica de imunodifusão em gel de agar (IDGA), todos os animais de 31 rebanhos do Estado de Pernambuco. Dos 2206 animais testados, 15,3% (n= 338) estavam infectados por SRLV. Os animais soropositivos estavam distribuídos em 74,2% dos rebanhos (n=23).

A avaliação do perfil lipídico de animais infectados por SRLV sem sintomatologia clínica, quando comparados aos de animais controle, sob as mesmas condições de manejo e alimentação, apresentaram os seguintes resultados: a) Os níveis de colesterol total foram significativamente mais elevados ($p<0.005$); b) O colesterol das lipoproteínas de elevada densidade (HDL) estava levemente aumentado, não sendo significativo; c) O colesterol das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) estava levemente baixo; d) O nível de triglicerídeo foi similar nos dois grupos; e) O colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estava significativamente elevado ($p<0.005$).

ABSTRACT

ABSTRACT

Small Ruminant Lentivirus (SRLV) cause chronic multisystemic progressive disease, with long incubation time. All breeds and ages of goats and sheep are susceptible to infection. The infection manifests as arthritis, pneumonitis, mammary gland infection and encephalomyelitis or even multiorgan simultaneously, which determines loss of weight and wasting until death. Persistent infection may occur, although several infected animals did not show any clinical signs but potentially spreading the virus in a silent form. The main route of infection is through ingestion of both milk and colostrum containing SRLV infected cells. Lateral transmission also occurs. In vivo, SRLV exhibits an affinity for cells of monocyte/macrophage lineage and dendritic cells. In vitro, SRLV replication and infection occur in cells of monocyte/macrophage lineage and cells derived from many tissues. The primary membrane synovial culture cells are largely used for SRLV replication and isolation. The capacity of cell growth of this system is limited until it reaches stage of cellular senescence.

In order to amplify cell culture, primary culture of goat synovial membrane cells, used for SRLV replication, were amplified by reutilization of seronegative fetus metacarp joints explants raising optimization of cellular production. The explants of goat synovial membrane resulted in six new series of initial primary culture. These cells supported satisfactory levels of production and permissive to SRLV replication. In vitro, based on observation of cytopathic effects BrPe1-01 and BrMg2-03 Brazilian field isolates of SRLV comparatively with CAEV Cork and Visna-maedi K1514 showed poorly infectivity. Viral antigens were not detected in the suspension of cultures in AGID test. Although viral antigens were detected by enzyme linked immunosorbent assay.

Aiming a better understanding of SRLV epidemiological features, a study to evaluate serological status of meat and dairy goats herds from Pernambuco, Brazilian Northeast was done. A total of 2206 goat serum were analyzed for antibodies against SRLV by agar gel immunodiffusion (AGID) test. The percentage

of animals with positive results was 15,3% (n=338), distributed in 74,2%(n=23) of the total herd.

The assessment of the influence of CAEV infection in naturally infected goats on serum neutral lipid and lipoprotein cholesterol in comparison to control group showed that: a) Total cholesterol concentrations were significantly ($P=0.003$) higher in the infected animals; b) High density lipoprotein-cholesterol were slightly increased but the differences were not significant; c) Very low density lipoprotein-cholesterol from the infected group were decreased differences were not significant; d) Triglyceride level from the infected group was similar to that from control group; and e) Low density lipoprotein-cholesterol was significantly ($P=0.004$) increased in the infected animals.

Palavras-chave: caprinos, lipídeos, CAEV, lentivírus de pequenos ruminantes, sorologia.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) *caprine arthritis-encephalitis virus* (CAEV) e maedi-visna causam doença progressiva multissistêmica em caprinos e ovinos, respectivamente (NARAYAN & CLEMENTS, 1989). Os SRLV compartilham similaridades genéticas, mecanismo molecular de replicação, morfologia e interações biológicas em seus hospedeiros (TORSTEINSDÓTTIR *et al.*, 1997; CASTRO, 1998; CALLADO 1999; MORNEX, 2003). Uma propriedade comum é a persistência da infecção no organismo mesmo frente à resposta imunológica, devido à restrição da replicação viral (GENDELMAN *et al.*, 1985).

Uma característica notável dos SRLV é a capacidade de variação genética, graças à alta frequência de mutações. A variação genética resulta no aparecimento de subpopulações virais heterogêneas conhecidas como *quasispecies* (LEROUX *et al.*, 1995; LEROUX *et al.*, 1997a; PASICK, 1998). Este conceito foi proposto por Eigen *et al.* (1981) e é definido como “população complexa de perpetuação própria de diversas entidades que atuam como uma única”. Evidências experimentais e argumentos teóricos indicam que a seleção opera no grupo dos lentivírus e que *quasispecies* inteiras são alvo de seleção ao invés do genoma viral individual. A diversidade e evolução lentiviral resulta da composição das seqüências dos genes que evoluem com diferentes velocidades, e da complexa interação vírus-hospedeiro (JOLLY & NARAYAN, 1989; MANSKY, 1998; CASTRO, 1998; ANDRÉSDÓTTIR, 2003; KARLSSON *et al.*, 2003). Os SRLV compreendem vários vírus isolados cujos protótipos são os vírus Maedi-visna K1514 e CAEV Cork (VALAS *et al.*, 1997, CASTRO *et al.*, 1999a, VALAS *et al.*, 2000).

O agente infeccioso dos SRLV pertence à família Retroviridae, subfamília Lentivirinae, gênero Lentivirus (ADAMS *et al.*, 1980a). Os lentivírus compõem grupo taxonômico de patógenos de interesse veterinário e médico (LEGASTELOIS *et al.*, 1996) (Tabela 1).

Tabela 1. Etiologias e principais patologias das infecções por lentivírus

Hospedeiro	Vírus*	Enfermidade
<i>Ungulados</i>		
Pequenos ruminantes	maedi-visna e CAEV	Pneumonia intersticial difusa, encefalomielite, artrite, mamite e emagrecimento.
Bovinos	BIV	Linfadenopatia e linfocitose.
	JDV	Emagrecimento, febre, anorexia, linfadenopatia e anemia.
Eqüídeos	EIAV	Pneumonia intersticial difusa, encefalite, febre, emagrecimento e anemia.
<i>Primates</i>		
Macacos	SIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, síndrome neurológica, pneumonia intersticial difusa e artrite.
Homem	HIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, linfadenopatia, síndrome neurológica e pneumonia intersticial difusa.
<i>Carnívoros</i>		
Felídeos	FIV	Imunodeficiência, infecções oportunistas, linfadenopatia, síndrome neurológica e emagrecimento

* CAEV – *caprine arthritis-encephalitis virus*; BIV – *bovine immunodeficiency virus*; JDV – *jembrana disease virus*; EIAV – *equine infectious anaemia virus*; SIV – *simian immunodeficiency virus*; HIV – *human immunodeficiency virus*; FIV – *feline immunodeficiency virus*. Dados obtidos de LEGASTELOIS *et al.* (1996).

1.1. Histórico

Maedi-visna, denominada nos Estados Unidos (EUA) como pneumonia progressiva ovina, foi a primeira infecção causada por lentivírus reconhecida internacionalmente como doença. Esta doença também foi o primeiro membro de uma nova categoria de doenças infecciosas lentas, descrita por SIGURDSSON, 1954. As primeiras descrições de doença com sintomatologia semelhante à da Maedi-visna foram feitas na África do Sul (MITCHELL, 1915) e nos EUA (MARSH, 1923), e receberam atenção por parte dos pesquisadores e criadores após uma epidemia de pneumonia progressiva (maedi) e paralisia (visna) em ovinos islandeses, entre 1939 e 1952, cuja origem se deve à importação de ovinos Karakul da Alemanha em 1931 (SIGURDSSON, 1954). A designação Maedi-visna foi escolhida para homenagear o trabalho de pesquisadores islandeses (THORMAR, 1965; THORMAR & HELGADOTTIR, 1965; STRAUB, 1970): Maedi (significa dispnéia) e visna (significa desorientação). Inicialmente Maedi-visna foi reconhecida como duas entidades distintas. Quando as primeiras amostras de vírus foram isoladas de ovinos afetados com visna (SIGURDSSON *et al.*, 1960) e maedi (SIGURDARDÓTTIR & THORMAR, 1964) observaram-se similaridades entre eles.

STUNZI *et al.* (1964) descrevem, pela primeira vez, caprinos adultos com artrite crônica na Suíça. No mesmo ano, RAJYA & SINGH (1964) descreveram alterações patológicas respiratórias semelhantes às de Maedi em caprinos na Índia. Mais tarde, NAKAGAWA *et al.* (1971) relataram alterações histopatológicas de poliartrite crônica em cabrito no Japão. Inicialmente, a Artrite Encefalite Caprina foi caracterizada por artrite progressiva em animais adultos e encefalomielite desmielinizante em cabritos de menos de 6 meses (CORK *et al.*, 1974). Posteriormente, o indício de que a doença era causada por um vírus foi confirmado (WEINHOLD *et al.*, 1974; HAJELA *et al.*, 1975).

No Brasil, as primeiras descrições de SRLV foram feitas no Rio Grande do Sul, com a identificação de caprinos (MOOJEN *et al.*, 1986) e ovinos (RAVAZZOLO *et al.*, 1995; SOTOMAIOR & MILCZEWSKI, 1997) soropositivos e

confirmação pelo isolamento do vírus em caprinos (HÖTZEL *et al.*, 1993; CASTRO *et al.*, 1999c) e ovinos (MILCZEWSKI *et al.*, 1997).

1.2. Aspectos Gerais

1.2.1. Estrutura da partícula lentiviral

Morfologicamente, os vírions dos SRLV são esféricos, apresentando 80 a 100 nm de diâmetro. O envelope viral é composto de fosfolipídeos e está associado covalentemente às glicoproteínas de superfície (SU) e transmembranária (TM) que contém determinantes biológicos importantes (NARAYAN *et al.*, 1984; HOUWERS & NAUTA, 1989; VALAS *et al.*, 2000; ADEBAYO *et al.*, 2002; BLAZEK *et al.*, 2004). Eles apresentam uma grande quantidade de ácido siálico na superfície do vírus (HUSO *et al.*, 1988). As proteínas internas são a da matriz (MA), a do capsídeo (CA) e a núcleo-proteína (NP). O capsídeo contém o genoma lentiviral com duas moléculas idênticas de RNA com polaridade positiva e apresentam nas extremidades 3' e 5' duas curtas seqüências repetidas (R) idênticas com mesma orientação e uma seqüência em cada extremidade, denominadas única 5 (U5) e única 3 (U3), que contém elementos requeridos para integração e iniciação da transcrição reversa (COBRINIK *et al.*, 1991). Após a transcrição reversa, o DNA proviral resultante apresenta duas regiões terminais não-codificantes (terminal longo repetido ou "LTR"- *long terminal repeat*), responsáveis pelo tropismo celular e tecidual (GABUZDA *et al.*, 1989; SUTTON *et al.*, 1997; AGNARSDÓTTIR *et al.*, 2000). A informação genética contida entre estas duas regiões extremas contém os genes codificantes para as proteínas estruturais: *gag* (codifica as proteínas internas, não glicosiladas), *env* (codifica as proteínas do envelope) e enzimas virais (*pol*) (PEPIN *et al.*, 1998; CALLADO *et al.*, 2001). O genoma lentiviral também contém várias pequenas fases abertas de leitura ("*open reading frames*" ou ORFs) *vif*, *rev* e *tat* que codificam proteínas regulatórias (CLEMENTS & PAYNE, 1994). O gene *vif* é essencial para infectividade de SRLV (SEROUDE *et al.*, 2001). Uma

proteína codificada por este gene protege o genoma viral de mutação em níveis elevados (KRISTBJÖRNSDÓTTIR *et al.*, 2004). Outra proteína codificada pelo gene *rev* é essencial para a replicação eficiente da amostra CAEV Cork (SCHOBORG *et al.*, 1994).

1.2.2. Replicação

O ciclo de replicação dos lentivírus (Figura 1) consiste de passos definidos, que requerem muitos elementos genéticos *cis* e *trans* (GUDMUNDSSON *et al.*, 2003). O primeiro evento do ciclo de replicação viral é a adsorção. Para que haja adsorção, faz-se necessário a presença do receptor específico para SRLV. Entretanto, a natureza exata do receptor celular para os SRLV ainda não está bem definida. *In vitro*, através da ligação do complexo anticorpo-vírus ao receptor Fc das imunoglobulinas, anticorpos neutralizantes facilitam a ligação e penetração do vírus visna em macrófagos (JOLLY *et al.*, 1989). Foi reconhecida como ligante do vírus maedi-visna, uma proteína de 50 kDa presente na superfície das células de membrana sinovial caprina e do plexo coróide ovino (CRANE *et al.*, 1991). Estudos têm revelado que para o CAEV pode ser um antígeno MHC classe II (DALZIEL *et al.*, 1991) ou um componente ou complexo membranário que interagem com SU do vírus (HULLINGER *et al.*, 1993).

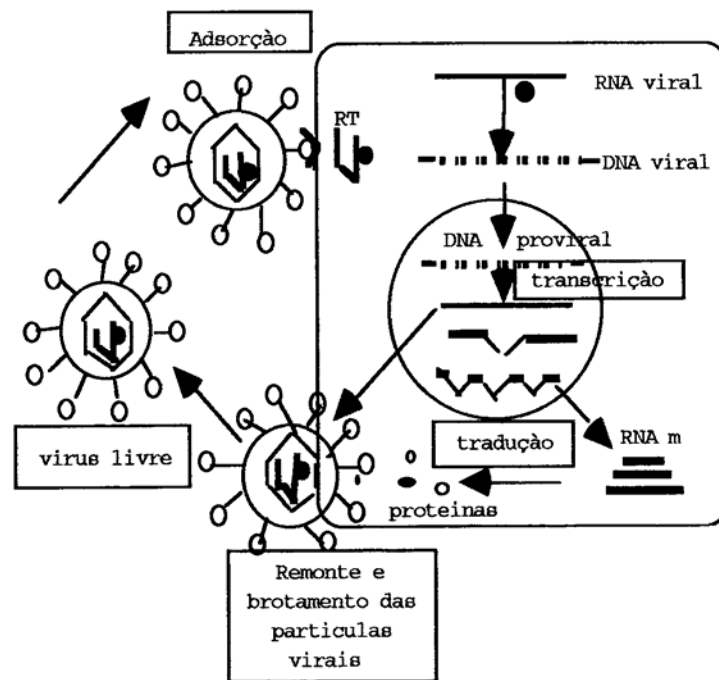


Figura 1: Ciclo de replicação dos Retrovírus (adaptado de Coffin, 1996).

Após a adsorção, o genoma lentiviral é liberado no citoplasma onde o RNA é dissociado das proteínas pela ação de enzimas lisossômicas e é transcrito em DNA proviral pela ação da transcriptase reversa (HAASE *et al.*, 1974). O DNA proviral se torna fita dupla e a enzima integrase viral, através de ligações covalentes, ligam o genoma viral ao DNA cromossomal do hospedeiro. Em seguida ocorre a transcrição do DNA proviral e síntese do RNA viral. Os fatores celulares de transcrição são os produtos dos genes c-fos e c-jun expressos durante ativação celular. Estes fatores são capazes de se fixar nos sítios AP-1 do LTR lentiviral e ativar a transcrição (SHIH *et al.*, 1992). O RNA viral é exportado com o auxílio de uma ou mais proteínas regulatórias virais. Estas também participam da replicação dos RNAs genômico e RNAm viral, que traduzirá as proteínas precursoras constituintes do virion (VIGNE *et al.*, 1982). As etapas finais do ciclo de replicação são a montagem, o processamento proteolítico dos polipeptídeos precursores e o brotamento das partículas virais (CLEMENTS & PAYNE, 1994).

Os lentivírus replicam em células terminalmente diferenciadas e ativadas, expressando IL-2 (NARAYAN *et al.*, 1992). Nas células do sistema fagocítico-mononuclear, a transcrição do genoma ocorre quando os monócitos maturam para macrófagos (GENDELMAN *et al.*, 1986). Este fenômeno é conhecido como replicação restrita e permite que o vírus permaneça indetectável nos monócitos por tempo prolongado (ZINK *et al.*, 1990). *In vitro*, em contraste com replicação lenta que ocorre *in vivo*, o ciclo de replicação é completado em algumas horas.

1.2.3. Propriedades

Os SRLV compartilham algumas características que promovem a persistência da infecção em seus hospedeiros. Inicialmente, o DNA proviral se integra no genoma celular, após a transcrição reversa do RNA viral nas células infectadas, permitindo que o vírus escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro e preserve o seu material genético. A segunda característica que permite a persistência da infecção é o tropismo e replicação em células do sistema imunológico, normalmente responsáveis pela eliminação das células infectadas, sem causar lise celular (NARAYAN *et al.*, 1983; JOLLY *et al.*, 1997; SINGH *et al.*, 1999). Terceiro, a restrição da replicação viral, com pouca ou quase nenhuma partícula viral, permite que as células infectadas pelo vírus escapem do sistema imunológico (CHEBLOUNE *et al.*, 1996; NARAYAN *et al.*, 1997; CALLADO *et al.*, 1999). Além disso, esses vírus acumulam alta taxa de mutação durante o processo de replicação resultante de falha na enzima transcriptase reversa em corrigir sequência de nucleotídeo (GAZIT *et al.*, 1992; MANSKY, 1998), resultando em variantes antigênicos (KNOWLES *et al.*, 1990; CHEEVERS *et al.*, 1993; LICHTENSTEIGER *et al.*, 1993) e replicação destes variantes antigênicos na presença de anticorpos neutralizantes (McGUIRE *et al.*, 1988; CHEEVERS *et al.*, 1991; SKRABAN *et al.*, 1999). Esta variação ocorre principalmente no gene *env* (BRAUN *et al.*, 1987; KNOWLES *et al.*, 1991; LEROUX *et al.*, 1997a; CASTRO *et al.*, 1999a; SKRABAN *et al.*, 1999; VALAS *et al.*, 2000) e ORFs.

1.2.4 Epidemiologia

Os SRLV apresentam distribuição cosmopolita, com prevalência mais elevada nos países com exploração tecnificada da ovino-caprinocultura. A infecção por SRLV acomete animais de ambos os sexos, várias raças e idades. Existem relatos de maior prevalência em algumas raças ovinas e caprinas e em animais do sexo masculino (CUTLIP *et al.*, 1988; ROWE & EAST, 1997). Um fator importante é o tempo de exposição para soroconversão, pois se têm observado que a frequência de soropositivos é maior em ovinos e caprinos mais velhos (HOUWERS & van der MOLEN, 1987; ROWE *et al.*, 1991; SARAIVA NETO *et al.*, 1995). No entanto, em rebanhos com alta taxa de infecção a soroprevalência pode ser elevada entre os animais jovens (EAST *et al.*, 1987)

O reservatório e a fonte de infecção dos SRLV são os animais infectados. A via digestiva é a principal via de transmissão através da ingestão de colostro e leite contaminados (ADAMS *et al.*, 1983; GUIGUEN *et al.*, 1990; PERETZ *et al.*, 1993). Estudos revelaram que células epiteliais obtidas do leite são permissivas a replicação de SRLV, sugerindo que estas células podem ser importantes para a disseminação da infecção (LERONDELLE *et al.*, 1999; MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999). Para ovinos, a principal via de transmissão é a via respiratória (BERRIATUA *et al.*, 2003; STRAUB, 2004). Contudo, a transmissão pode ocorrer também pelas fezes, saliva, secreções respiratória e urogenital e, ainda, leite contaminado dos copos das ordenhadeiras mecânicas (PERETZ *et al.*, 1993). Estudos recentes reportam a detecção de SRLV na terceira pálpebra, sugerindo sua possível participação na transmissão da infecção (CAPUCCHIO *et al.*, 2003). No que diz respeito à transmissão vertical tem sido isolado SRLV de cordeiros obtidos por cesariana (CUTLIP *et al.*, 1981), já foi detectado DNA proviral em leucócitos de cordeiros antes da ingestão de colostro (BRODIE *et al.*, 1994) e soroconversão de cabritos separados da mãe imediatamente após o parto e que receberam colostro e leite de vaca pasteurizados (EAST *et al.*, 1993). Já a transmissão venérea, é possível uma vez que foi detectado RNA viral no sêmen de: a) carneiros naturalmente infectados (CHASTANG *et al.*, comunicação pessoal); b) carneiros experimentalmente infectados por SRLV e *Brucella ovis* (de la CONCHA- BERMEJILLO *et al.*, 1996); c) caprinos experimentalmente

infectados (TRAVASSOS *et al.*, 1998), d) caprinos naturalmente infectados, e e) carneiros (TRAVASSOS *et al.*, 1999). Outro achado que corrobora com a possibilidade de transmissão venérea é que *in vitro* CAEV replica eficientemente em células da granulosa caprina, sugerindo que estas células possam servir de reservatório do vírus durante a fase subclínica (LAMARA *et al.*, 2001).

A transmissão entre caprinos e ovinos e vice-versa foi demonstrada experimentalmente (BANKS *et al.*, 1983; OLIVER *et al.*, 1985; DICKSON & ELLIS, 1989). Estudos filogenéticos confirmaram a existência de transmissão entre caprinos e ovinos (ZANONI *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 1999a; SHAH *et al.*, 2004). A transmissão para outros bovídeos também já foi demonstrada (GUIGUEN *et al.*, 2000; MORIN *et al.*, 2003). Entretanto, tem sido sugerido que organismo do hospedeiro não-natural é capaz de eliminar a infecção pois a inoculação experimental de bezerros resultou em infecção produtiva durante quatro meses. Após este período, houve uma cura espontânea da infecção por SRLV (MORIN *et al.*, 2003).

1.3. Aspectos clínicos e anátomo-histopatológicos

1.3.1. Patogênese

Após a introdução de SRLV no organismo animal, o vírus infecta células do sistema fagocítico-mononuclear, produzindo infecção persistente. A regulação da expressão viral durante a diferenciação dos monócitos é passo essencial para a patogênese pois as manifestações clínicas estão localizadas nos tecidos que expressão SRLV (LAIRMORE *et al.*, 1987). A resposta imunológica celular e humoral são de intensidade variada e não protege contra a infecção (CHEEVERS *et al.*, 1993; BERTONI *et al.*, 1994). Estudos sequenciais têm revelado que a primeira resposta, detectada em torno da terceira semana após a infecção, é principalmente dirigida à proteína do capsídeo; para as demais proteínas (núcleo-proteína, matriz, transmembranária e de superfície), são produzidos anticorpos por volta da quinta semana (de la CONCHA-BERMEJILLO *et al.*, 1995;

ADEBAYO *et al.*, 2002). Os anticorpos neutralizantes são produzidos tardiamente, em quantidade insuficiente, e são de baixa afinidade, de forma que não conseguem interromper o ciclo de replicação viral (NARAYAN *et al.*, 1984; KENNEDY-STOSKOPF & NARAYAN, 1986; CHEEVERS *et al.*, 1993; BERTONI *et al.*, 1994; BERTONI *et al.*, 2000). Neste aspecto, CAEV difere de Maedi-visna pois, este induz prontamente a produção de anticorpos neutralizantes (NARAYAN *et al.*, 1997). Já os anticorpos passivos adquiridos pela ingestão de colostro ou leite infectados persistem em níveis detectáveis no soro de cabritos por pelo menos seis meses (ADAMS *et al.*, 1983; MacKENZIE *et al.*, 1987; CUTLIP *et al.*, 1988). A destruição de células infectadas é realizada pelos linfócitos T CD4⁺ (REYBURN *et al.*, 1992b) e T CD8⁺ (LICHTENSTEIGER *et al.*, 1993; BLACKLAWS *et al.*, 1994) que proliferam durante a infecção. Entretanto, estes linfócitos não são capazes de destruir as células que não expressam o provírus (células latentemente infectadas), havendo produção de anticorpos e citocinas que participam do desenvolvimento das alterações imunopatológicas que ocorrem nos órgãos-alvo (DeMARTINI *et al.*, 1993; LEGASTELOIS *et al.*, 1996; BERTONI *et al.* 2000). A presença do vírus desregula a expressão de citocinas nos macrófagos (ADEYEMO *et al.*, 1997; LECHNER *et al.*, 1997). As alterações imunopatológicas resultam da modificação da atividade ou produção de citocinas como IL-1 e TNF pelos monócitos (WERLING *et al.*, 1994). Foram detectados níveis elevados de IFN no líquido sinovial de caprinos naturalmente infectados por SRLV (YILMA *et al.*, 1988) e a expressão de TNF α em caprinos com artrite causada por SRLV (LECHNER *et al.*, 1996). O IFN é responsável pelo desenvolvimento da resposta linfoproliferativa por induzir a expressão de antígenos (ZINK *et al.*, 1987), acelerando a entrada de células nos locais de injúria, e ao mesmo tempo, ampliando o número de células para a replicação viral (LAIRMORE *et al.*, 1988a). O IFN- γ , uma citocina secretada pelas células T e Células NK em resposta a infecção viral, estimula a ativação do LTR do CAEV, podendo contribuir para a conversão da replicação na forma latente para níveis elevados de replicação nos animais infectados (TONG-STARKSEN *et al.*, 1996).

Outras alterações incluem: inversão da razão CD4⁺/CD8⁺ no sangue periférico e órgão-alvo (JOLLY *et al.*, 1997); diminuição do número de plasmócitos e diminuição dos níveis de IFN-2. Estudos *in vitro* indicam que ocorre diminuição da atividade celular supressora induzida pela concanavalina (ELLIS &

DeMARTINI, 1985; KENNEDY-STOSKOPF *et al.*, 1989); alteração das propriedades celulares quanto à aderência, fagocitose bacteriana, bem como na expressão de moléculas que medeiam a aderência (fibronectina) e apresentação de antígenos (MHC classes I e II) (MONLÉON *et al.*, 1997); e redução na proporção de monócitos no sangue periférico de animais infectados (JOLLY *et al.*, 1997). A frequência e a severidade das lesões podem estar associadas a fatores do genoma do hospedeiro (RUFF & LAZARY, 1988; DOLF & RUFF, 1994; de la CONCHA-BERMEJILLO *et al.*, 1995) e da amostra viral (CHEEVERS *et al.*, 1988; LAIRMORE *et al.*, 1988b). Em adição, Infecções oportunistas podem induzir a secreção de fatores celulares que modulem a replicação viral e a manifestação da infecção como doença clinicamente aparente (ELLIS *et al.*, 1994; LUJÁN *et al.*, 1994).

1.3.2. Formas de apresentação

O período de incubação, em geral, é determinado pelo grau de replicação do vírus. A ocorrência de infecção aguda está associada com replicação rápida e produção de elevada quantidade de partículas virais. O mais comum é que a doença seja crônica, associada com replicação lenta e de expressão restrita. A maioria dos animais infectados com SRLV não desenvolve sintomas clínicos, apesar da infecção ter ocorrido principalmente nos primeiros meses de vida, através da ingestão de colostro ou leite de cabras infectadas (HOUWERS & VAN der MOLEN, 1987; ROWE *et al.*, 1991; SARAIVA NETO *et al.*, 1995; ARSENAULT *et al.*, 2003a e b). Portanto, a infecção caracteriza-se por alta prevalência de animais soropositivos, aparentemente saudáveis.

O desenvolvimento de manifestação clínica se restringe a tecidos nos quais os macrófagos infectados expressam SRLV (LAIRMORE *et al.*, 1987). Os SRLV podem causar infecção multissistêmica, afetando mais severamente as SNC, articulações, pulmões e glândulas mamárias, resultando em quatro condições clínicas, que ocorrem isoladas ou simultaneamente: encefalomielite, artrite, pneumonia intersticial e mastite (KENNEDY-STOSKOPF *et al.*, 1985; PÉRETZ *et al.*, 1993). A frequência e intensidade das lesões causadas pela

infecção por SRLV são diferentes, porém as lesões apresentam basicamente as mesmas características em caprinos e ovinos (NARAYAN & CORK, 1985).

A forma artrítica é geralmente observada em animais adultos cujos sintomas inclui a ocorrência de higromas com vários graus de claudicação, sendo a articulação cárpica a mais freqüentemente envolvida (Figura 2). Microscopicamente, as lesões consistem de hipertrofia da vilosidade da membrana com angiogênese e infiltração de células mononucleares e alterações degenerativas com necrose da vilosidade da membrana com perda da vascularização e infiltrados mononucleares (ADAMS *et al.*, 1980b; WOODWARD *et al.*, 1982; NARAYAN *et al.*, 1992; PEREIRA, 1995).



Figura 2: Cabra soropositiva apresentando artrite.

A encefalite, geralmente observada em cabritos de 2 a 4 meses, é a forma menos comum de apresentação da doença e é evidenciada pela ataxia que pode progredir para paraparesia ou tetraparesia ou paralisia, tremores, opistótono, torcicolo com movimentos de pedalagem (CORK *et al.*, 1974) (Figura 3). Os animais permanecem afebris e apresentam apetite normal. As lesões microscópicas são meningo-encefalomielite e desmielinização (CORK &

NARAYAN, 1980; NORMAN & SMITH, 1983; GONZALEZ *et al.*, 1987; CUTLIP *et al.*, 1988).

A forma pulmonar é mais importante para ovinos, sendo a pneumonia intersticial raramente observada em caprinos. Os sintomas são tosse, dispnéia, taquipnéia e som úmido à auscultação. Durante as necrópsias observa-se que os pulmões de animais infectados pesam duas a três vezes mais que os normais e apresentam aderências pleurais com focos cinzas na superfície pleural, que correspondem às áreas de linfoproliferação (NARAYAN & CORK, 1985; CUTLIP *et al.*, 1988; PERETZ *et al.*, 1993; PREZIUSO *et al.*, 2003), sendo a carga de vírus e a antigenemia correlacionadas com a intensidade da pneumonia (BRODIE *et al.*, 1992a). As lesões típicas obedecem a graus de desenvolvimento diferenciados, iniciando-se por pneumonia intersticial que evolui para pneumonia broncointersticial (PEREIRA, 1995), com característica proliferação de células linfóides nos pulmões e linfonodos (OLIVER *et al.*, 1981; ELLIS & DeMARTINI, 1985).



Figura 3: Cabrito soropositivo apresentando quadro neurológico.

A mastite fibrosa é observada no período do puerpério e é caracterizada pelo endurecimento da glândula mamária pelo depósito de tecido conjuntivo fibroso e agalactia decorrente da expressão viral dependente do estado fisiológico do úbere (Figura 4). Entretanto, tem sido reportado que a qualidade do

leite não é alterada, mas a produção diminui (NORD & ADNOY, 1997). Microscopicamente, as lesões consistem em hiperplasia linfóide folicular ao redor dos ductos lactíferos, infiltração intersticial de células mononucleares e fibrose (LERONDELLE *et al.*, 1989).

Outras evidências da doença clínicas incluem: emaciação, dispnéia e desenvolvimento de infecções oportunistas (DeMARTINI *et al.*, 1993; MORNEX *et al.*, 1994), emagrecimento progressivo e pêlos eriçados (CRAWFORD & ADAMS, 1981). Em adição às lesões descritas, outros achados patológicos são: mineralização, principalmente da sinóvia, arterite, pericardite, pleurite, depósitos amilóides, nefrite intersticial não supurativa e marcada infiltração linfocítica do intestino, rins, pulmões, glândulas tireóides (CRAWFORD *et al.*, 1980; ZINK *et al.*, 1990) e útero (ALI, 1987).

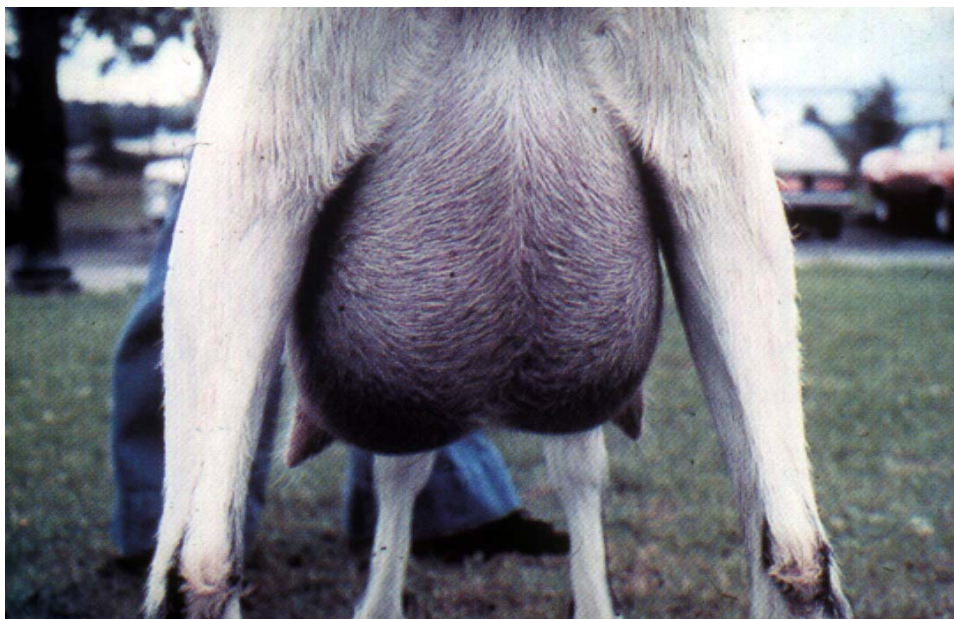


Figura 4: Cabra soropositiva com mastite.

1.3.3 Lentivirose x Perfil lipídico

O perfil lipídico tem sido usado para prever problemas periparto, diagnóstico de doenças metabólicas e avaliar o estado nutricional dos animais.

Para melhor conhecimento da fisiopatologia das lentivirose tem sido proposto o estudo sobre o metabolismo lipídico. No homem, o metabolismo lipídico tem sido alvo de atenção em pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MEYER *et al.*, 1998; HADIGAN *et al.*, 1999; YANOVSKI *et al.*, 1999), nesses pacientes têm sido observadas alterações metabólicas. Em indivíduos infectados pelo vírus HIV as lipoproteínas (responsáveis pelo transporte dos lipídeos na circulação) diferem em tamanho, densidade e composição química (lipídica e protéica). O colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foi positivamente correlacionado com albuminemia (NUNEZ & CHRISTEFF, 1994). Em comparação com indivíduos controle de mesma faixa etária, pacientes com imunodeficiência adquirida (AIDS) e os portadores do vírus HIV, porém sem evidências clínicas de imunodeficiência, apresentam reduções nos níveis de colesterol total, colesterol das lipoproteínas de alta densidade (HDL-C), colesterol das LDL (LDL-C), apolipoproteínas A-I e B-100. A infecção desenvolvida por pacientes com AIDS é caracterizada por perda de peso e hipertrigliceridemia, bem como aumento de ácidos graxos livres (GRUNFELD *et al.*, 1992; FEINGOLD *et al.*, 1993). Contudo, pacientes portadores do vírus HIV, porém sem evidências clínicas de AIDS, não apresentam aumento nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos e ácidos graxos livres; porém, em indivíduos portadores de HIV apresentando diarreia e sintomas da mal-absorção (BENHAMOU *et al.*, 1994), foi encontrada redução significativa nos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos. As alterações bioquímicas reportadas parecem estar associadas com o estágio clínico mais avançado da doença. Em trabalho com pacientes em vários estágios da doença, foi demonstrado que a alteração no perfil dos ácidos graxos plasmáticos consiste na redução de ácidos graxos poliinsaturados de 18-C (linoleico e linolênico) e aumento de ácido araquidônico (20-C); os mais baixos níveis de ácidos graxos poliinsaturados foram encontrados no subgrupo de pacientes no estágio mais avançado da doença (AGOSTONI *et al.*, 1998). Por outro lado, não se conhece as alterações metabólicas nos animais infectados por SRLV, principalmente no que diz respeito ao metabolismo lipídico de animais infectados com ou sem o desenvolvimento das alterações clínicas características dessa infecção viral.

1.4. Diagnóstico

Os testes sorológicos são a forma mais prática de diagnóstico de SRLV, sendo a imunodifusão em gel de Agar (IDGA) (CUTLIP *et al.*, 1977; ADAMS & GORHAM, 1986; SIMARD & BRISCOE, 1990; KNOWLES *et al.*, 1994; ABREU *et al.*, 1998; CELER Jr *et al.*, 1998; SIHVONEN *et al.*, 2000) e o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (SCHROEDER *et al.*, 1985; ARCHAMBAULT *et al.*, 1988; CELER Jr *et al.*, 1998) os mais comumente utilizados. Os ensaios imunoenzimáticos (EIE) têm sido desenvolvidos devido a maior sensibilidade e possibilidade de quantificação e automação. Eles utilizam antígenos CAEV (SCHROEDER *et al.*, 1985; ARCHAMBAULT *et al.*, 1988; HECKERT *et al.*, 1992; CASTRO *et al.*, 1999b; HERMANN *et al.*, 2003 a, b), Maedi-visna (HOUWERS *et al.*, 1982; VITU *et al.*, 1982; HOUWERS & SHAAKE, 1987; ZANONI *et al.*, 1989, 1994; CELER Jr *et al.*, 1998; FEVEREIRO *et al.*, 1999) ou purificados como, por exemplo, proteína interna ou transmembranária recombinante do CAEV (RIMSTAD *et al.*, 1994; ALFONSO CLAVIJO & THORSEN, 1995) ou Maedi-visna (REYBURN *et al.*, 1992a; KWANG & CUTLIP, 1992; ROSATI *et al.*, 1994; KWANG *et al.*, 1995; KEEN *et al.*, 1995 e 1996; POWER *et al.*, 1995; BOSHOFF *et al.*, 1997). O uso de EIE para pesquisa de anticorpos no leite ou colostro demonstrou não haver grandes vantagens quanto à sensibilidade e detecção mais precoce da infecção em relação aos testes com soro (MOTHA & RALSTON, 1994).

A sensibilidade e a confiabilidade de um teste sorológico não dependem apenas do tipo de teste utilizado, mas também são influenciadas pela metodologia adotada para o preparo do antígeno, escolhas da amostra virais e pelo conteúdo dos componentes virais mais importantes. A baixa sensibilidade do IDGA pode ser parcialmente explicada pelo mecanismo de interação anticorpo-epítopo. A precipitação em IDGA requer múltiplas interações epítopo-anticorpo enquanto o ELISA requer a ligação de apenas um epítopo pelo anticorpo para a obtenção de resultado positivo. As diferenças na sensibilidade entre os dois testes pode ser resultado da flutuação da resposta imune contra as proteínas *gag* e *env* com a progressão da doença (HOUWERS & NAUTA, 1989).

Outros testes também utilizados são: imunofluorescência (REISCHAK, 2000), Western blotting e imunoprecipitação (GOGOLEWSKI *et al.*, 1985; KNOWLES, 1997). Estes últimos são recomendados para detecção qualitativa de anticorpos contra as principais proteínas virais.

O diagnóstico da infecção pelo isolamento e identificação do agente não é rotineiramente empregado por ser demorado, dispendioso e pode resultar em falso negativo. As culturas primárias de células de membrana sinovial são as mais usadas para o isolamento e caracterização biológica (CRAWFORD *et al.*, 1980; NARAYAN *et al.*, 1980). Os SRLV são capazes de infectar e replicar em células terminalmente diferenciadas que não estejam se dividindo (NARAYAN *et al.*, 1982). A restrição à replicação viral que ocorre *in vivo* é superada *in vitro*, permitindo que o vírus associado à célula inicie sua produção extracelular de partículas virais. A formação de efeito citopático pode ocorrer em alguns dias, semanas ou requerer meses após o cultivo (CRAWFORD *et al.*, 1980). O efeito citopático consiste na formação de sincício com morte celular (DAHLBERG *et al.*, 1981; KLEVJER-ANDERSON & CHEEVERS, 1981; GENDELMAN *et al.*, 1997), resultado da interação entre as glicoproteínas do envelope viral e a membrana celular (BOLNDIN, 1989).

Uma alternativa para a detecção de SRLV nos estágios iniciais da infecção ou identificação de animais com sorologia dúbia ou ainda, devido à restrição da replicação é a reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR têm sido utilizada com iniciadores derivados das seqüências dos genes *gag* ou *pol*, para detecção de DNA proviral ou RNA viral em leucócitos, células do leite, lavado brônquio-alveolares, líquidos sinoviais e células obtidas por tripsinização de monocamadas ou explantes (REDDY *et al.*, 1993; RIMSTAD *et al.*, 1993; BARLOUGH *et al.*, 1994; LEROUX *et al.*, 1995 e 1997b; CHEBLOUNE *et al.*, 1996; RUSSO *et al.*, 1997; CASTRO *et al.*, 1999c; ZHANG *et al.*, 2000). Para aumentar a quantidade de produto amplificado, tem-se usado a *nested* PCR (BARLOUGH *et al.*, 1994; LEROUX *et al.*, 1995). Recentemente, foi testada a combinação da PCR com a medida da transferência de energia por ressonância fluorescente que permitiu a criação de ensaio ultra-sensível, capaz de detectar menos que quantidades zeptomolar de seqüências de ácido nucléico (GUDMUNDSSON *et al.*, 2003).

1.5. Estudo de amostras brasileiras de SRLV

No final da década de 90 foi relatado o isolamento e a caracterização biológica e molecular de várias amostras de SRLV de caprinos dos Estados de Minas Gerais (amostras BrMg1-01, BrMg1-02, BrMg2-01, BrMg2-02 e BrMg2-03) e Pernambuco (BrPe1-01), que revelou a existência de dois fenótipos em cultivo celular e dois grupos filogenéticos principais (CASTRO *et al.*, 1999a). Quando do isolamento primário, as amostras BrMg1-01 e BrMg1-02 apresentaram comportamento indicativo de persistente e as amostras BrMg2-01, BrMg2-02, BrMg2-03 e BrPe1-01 de líticas (CASTRO *et al.*, 1999c). O sequenciamento de parte do genoma e a análise filogenética possibilitaram a classificação de três amostras (BrMg1-01, BrMg1-02 e BrMg2-03) como filogeneticamente mais próxima da amostra caprina CAEV Cork; a amostra BrPe1-01 foi classificada como filogeneticamente mais próxima da amostra ovina maedi-visna K1514 (CASTRO *et al.*, 1999a). Anteriormente já haviam sido isoladas em ovinos amostras virais mais próxima de CAEV Cork (LEROUX *et al.*, 1995; LEROUX *et al.*, 1997a).

A ocorrência de transmissão viral entre caprinos e ovinos e vice-versa já havia sido anteriormente reportada em condições experimentais (BANKS *et al.*, 1983; OLIVER *et al.*, 1985; DICKSON & ELLIS, 1989). Contudo, a existência de caprino infectado naturalmente com maedi-visna foi descrita pela primeira vez por CASTRO *et al.* (1999a). Estudos envolvendo o sequenciamento dos clones obtidos revelou que as amostras provenientes do rebanho do Estado de Minas Gerais foram significativamente variáveis, enquanto a amostra pernambucana BrPe1-01 foi a única que não apresentou variação nucleotídica, indicativo de amostra mais estável (CASTRO *et al.*, 1999a).

A amostra BrPe1-01 foi isolada de caprino da raça Saanen com desconforto respiratório, parcialmente debilitado e sem alterações articulares, proveniente de um rebanho fechado, importado da Inglaterra na década de 80. Ao exame *pos-mortem* foram observadas áreas discretamente marmóreas na região dos lobos diafragmáticos dos pulmões, que ao corte se aprofundavam pelo parênquima. Ao exame microscópico observou-se discreta pneumonia intersticial, caracterizada por infiltração linfocítica difusa (CASTRO *et al.*, 1999c). A

caracterização preliminar da infecção de células de membrana sinovial caprinas e ovinas pelas amostras BrPe1-01 e BrMg2-03 indicou que houve restrição da replicação (CALLADO *et al.*, 1999).

Tendo em vista a importância econômica da ovino-caprinocultura para a região Nordeste do Brasil e o impacto das lentivirose para a exploração desta atividade (GUNN *et al.*, 1998; ARSENAULT *et al.*, 2003a), os estudos sobre SRLV no Brasil, ainda escassos são importantes e necessitam de maior atenção por parte dos cientistas. Neste sentido, a maioria dos estudos realizados tem relatado inquéritos sorológicos em 15/27 Estados brasileiros (Tabela 2) e isolamentos virais (HOTZEL *et al.*, 1993; ABREU 1996; CASTRO *et al.*, 1999c), os quais têm revelado prevalência da infecção em cerca de 30% nas criações leiteiras especializadas. As perdas associadas à infecção por SRLV incluem reduções de: 38% na eficácia reprodutiva, de 5,6% no peso ao nascer, de 23, 7% na taxa de crescimento, de 22,5% na produção de leite e de 7,2% no período de lactação (GREENWOOD, 1995; ARSENAULT *et al.*, 2003a). Além disso, ocorrem prejuízos financeiros decorrentes das perdas associadas à desvalorização comercial de criatórios positivos e custos com os programas de controle.

Tabela 2. Distribuição da infecção por SRLV no Brasil

Estados	Referência
Rio Grande do sul	MOOJE <i>et al.</i> , 1986; DAL PIZZOL <i>et al.</i> , 1989;
Bahia	FITERMAN, 1988; ASSIS & GOUVEIA, 1994; ALMEIDA <i>et al.</i> , 2001, EDELWEIS <i>et al.</i> , 2001
Ceará	PINHEIRO <i>et al.</i> , 1994; ASSIS & GOUVEIA, 1994; ALVES & PINHEIRO, 1997, MELO & FRANKE, 1997
São Paulo	GARCIA <i>et al.</i> , 1992; SIMIONI LEITE <i>et al.</i> , 2003
Minas Gerais	ASSIS & GOUVEIA, 1994; DEZAN, 1996; CASTRO <i>et al.</i> , 1999c
Rio de Janeiro	ASSIS & GOUVEIA, 1994; CUNHA & NASCIMENTO, 1995
Pernambuco	CASTRO <i>et al.</i> , 1994; SARAIVA NETO <i>et al.</i> , 1995; CASTRO <i>et al.</i> , 1999c; CASTRO <i>et al.</i> , 2000; CALLADO <i>et al.</i> , 2003; FALCÃO <i>et al.</i> , 2003, OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2003
Maranhão	ALVES & PINHEIRO, 1997
Pará	RAMOS <i>et al.</i> , 1996
Piauí	PINHEIRO <i>et al.</i> , 1996
Paraná	SOTOMAIOR & MILCZEWSKI, 1997
Rio Grande do Norte	SILVA <i>et al.</i> , 2001 e 2003
Paraíba	SOUZA & ALVES, 1999; CASTRO <i>et al.</i> , 2000
Sergipe	MELO <i>et al.</i> , 2003
Goiás	SANTIN <i>et al.</i> , 2002

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Otimizar o processo de cultura celular através da re-utilização de explantes de membrana sinovial dos carpos de fetos, possibilitando diversos reinícios de células nas primeiras passagens oriundos de uma mesma fonte que servirá para replicação viral.

2. Avaliar a infecção de células de membrana sinovial pelas amostras BrPe1-01 e BrMg2-03 de SRLV.

3. Investigar a soroprevalência de SRLV em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco.

4. Estudar o perfil lipídico de cabras leiteiras infectadas por SRLV e que não apresentam sintomas clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, S. R. O., CASTRO, R. S., NASCIMENTO, S. A., SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus maedi-visna para utilização em teste de imunodifusão em agar-gel. *Pesq. Vét. Bras.*, 18 (2): 57-60, 1998.

ADAMS, D. S., CRAWFORD, T. B. CAE: a viral arthritis-encephalitis syndrome in goats. *Int. Goat and Sheep. Res.*, 1(2):168-172, 1980a.

ADAMS, D. S., CRAWFORD, T. B., BANKS, K. L., McGUIRE, T. C., PERRYMAN, L. E. Immune response of goats persistently infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Infect. and Immun.*, 28(2): 421-427, 1980b.

ADAMS, D. S., GORHAM, J. R. The gp 135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p 28 in immunodiffusion serology. *Res. Vet. Sci.*, 40: 157-160, 1986.

ADAMS, D. S., KLEVJER-ANDERSON, P., CARLSON, B. S., McGUIRE, T. C. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, v. 44, p. 1670-1675, 1983.

ADEBAYO, I.A., WALBEY, D., ADEYEMO, O. Host differences in serum antibody response during infection of goats by caprine arthritis-encephalitis virus. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. On line Pub: OL309-15, 2002.

ADEYEMO, O., GAO, R.-J., LAN, H.-C. Cytokine production *in vitro* by macrophages of goats with caprine arthritis-encephalitis. *Cel. Mol. Biol.*, 43(7): 1031-1037, 1997.

AGNARSDÓTTIR, G., THORSTEINSDÓTTIR, H., ÓSKARSSON, T., MATTHÍASDÓTTIR, S., HAFLIDADÓTTIR, B. St., ANDEÉSSON, Ó. S. *et al.* The long terminal repeat is determinant of cell tropism of maedi-visna virus. *J. Gen. Virol.*, 81: 1901-1905, 2000.

AGOSTONI, C., ZUCCOTTI, G. V., RIVA, E., DECARLIS, S., BERNARDO, L., BRUZZESE, M. G. *et al.* Low levels of linoleic acid in plasma total lipids of HIV-1 seropositive children. *J. Am. Coll. Nutr.*, 17: 25-29, 1998.

ALFONSO CLAVIJO, THORSEN, J. bacterial expression of caprine arthritis-encephalitis virus *gag* and *env* proteins and their use in enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.*, 56: 841-848, 1995.

ALI, O. A. Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. *Vet. Rec.*, 121: 131-132, 1987.

ALMEIDA, M. G. A., ANUNCIAÇÃO, A. V. M., FIGUEREDO, A., MARTINEZ, T. C. N. LABORDA, S. S. Dados sorológicos sobre a presença e distribuição da artrite encefalite caprina (CAE) no estado da Bahia, Brasil. *Rev. Bra. Saúde Prod. Anim.*, 1: 78-83, 2001.

ALVES, F.S.F., PINHEIRO, R. R. Presença da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. Anais. Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997, p. MVP 008.

ANDRÉSDÓTTIR, V. Evidence for recombination in the envelope gene of maedi-visna virus. *Vir Genes*, 27(1): 5-9, 2003.

ARCHAMBAULT, D., EAST, N., PERK, K., DAHLBERG, J. E. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 971-975, 1988.

ARSENAULT J., GIRARD C., DUBREUIL P., DAIGNAULT D., GALARNEAU J. R., BOISCLAIR J. *et al.* Prevalence of and carcass condemnation from maedi-visna paratuberculosis and caseous lymphadenitis in culled sheep from Quebec, Canada. *Prev. Vet. Med.*, 59(1-2): 67-81, 2003b.

ARSENAULT, J., DUBREUIL, P., GIRARD, C., SIMARD, C., BELANGER, D. Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev. Vet. Med.*, 59(3): 125-137, 2003a.

ASSIS A.P.M.V., GOUVEIA A.M.G. Evidência sorológica de Lentivírus (Maedi Visna/Atrite-encefalite caprina) em rebanhos nos Estados de MG, RJ, BA e CE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23, 1994, Olinda., 1994. p. 104. Resumo

BANKS, K. L., ADAMS, D. S., McGUIRE, T. C., CARLSON, J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.*, 44(12): 2307-2310, 1983.

BARLOUGH, J., EAST, N., ROWE, J. D., van HOOSEAR, K., DEROCK, E., BIGORNIA, L. *et al.* Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Meth.*, 50: 101-114, 1994.

BENHAMOU, Y., HILMARSDOTTIR, I., DESPORTES-LIVAGE, I., HOANG-C., DATRY, A., DANIS, M. *et al.* Association of lipid accumulation in small intestinal mucosa with decreased serum triglyceride and cholesterol levels in AIDS. *Diag. Dis. Sci.*, 39(10): 2163-2169, 1994.

BERRIATUA, E., ALVAREZ, V., EXTRAMIANA, B., GONZALEZ, L., DALTABUIT, M., JUSTE, R. Transmission and control implications of seroconversion to maedi-visna vírus in Basque dairy-shhep flocks. *Prev. Vet. Med.*, 60(4): 265-279, 2003.

BERTONI, G., HERTIG, C., ZAHNO, M.-L., VOGT, H.-R., DUFOUR, S., CORDANO, P. *et al.* B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus and antibody response in infected goats. *J. Gen. Virol.*, 81: 2929-2940, 2000.

BERTONI, G., ZAHNO, M. L. ZANONI, R., VOGT, H. R., PETERHANS, E., RUFF, G. *et al.* Antibody reactivit to the immunodominant epitopes of the caprine

arthritis-encephalitis virus gp38 transmembrane protein associates with the development of arthritis. *J. Virol.* 68: 7139-7147, 1994.

BLACKLAWS, B. A., BIRD, P., ALLEN, D., MacCONNELL, I. Circulating cytotoxic T lymphocyte precursors in maedi-visna virus-infected sheep. *J. Gen. Virol.*, 75: 1589-1596, 1994.

BLAZEK, D., CELER, V., NAVRATILOVA, I., SKLADAL, P. Generation and characterization of single-chain antibody fragments specific against transmembrane envelope glycoprotein gp 46 of maedi-visna virus. *J. Virol. Meth.*, 115(1): 83-92, 2004.

BLONDIN, I., GRILLET, C., THIOGANE, Y. 1989. Formation de syncytia en culture et analyse de la composition protéique de plusieurs souches de virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV). *Anns. Rech. Vet.*, 20:153-158.

BOSHOFF, C. H., DUNGU, B., WILLIAMS, R., VORSTER, J., CONRADIE, J. D., VERWOERS, D. W. *et al.* Detection of maedi-visna virus antibodies using a single fusion transmembrane-core p25 recombinant protein ELISA and a modified receiver-operating characteristic analysis to determine cut-off values. *J. Virol. Methods.* 63: 47-56, 1997.

BRAUN, M. J., CLEMENTS, J. E., GONDA, M. A. The visna virus genome: evidence of hypervariable site in the *env* gene and sequence homology among lentivirus envelope proteins. *J. Virol.*, 61(12) : 4046-4054, 1987.

BRODIE, S. J., de la CONCHA-BERMEJILLO, A., KOENIG, G., SNOWDER, G. D., DeMARTINI, J. C. Maternal factors associated with prenatal transmisión of ovine lentivirus. *J. Infect. Dis.*, 169: 653-657, 1994.

BRODIE, S. J., MARCOM, K. A., PEARSON, L. D., ANDERSON, B. C., de la CONCHA-BERMEJILLO, A., ELLIS, J. A., *et al.* Effects of virus load in the pathogenesis of lentivirus-induced lymphoid interstitial pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 166: 531-541, 1992a.

CALLADO, A. K. C. *Caracterização preliminar da infecção de células de membrana sinovial por amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes*. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará, 1999. 50p. Dissertação (Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes).

CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S., NASCIMENTO, S. A., SILVA-RODRIGUES, M. I. M., PINTO-JÚNIOR, J. H., TEIXEIRA, M. F. S. Caracterização preliminar da infecção de células da membrana sinovial por amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes. *Ciência Vet. Tróp.*, 2(3): 152-159, 1999.

CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S., TEIXEIRA, M. F. S. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. *Braz. J. Vet. Res.*, 21(3): 87-97, 2001

CALLADO, A. K. C., FALCÃO, L. S. P. C. A., CASTRO, R. S., OLIVEIRA, E. J. C., FALCÃO FILHO, M. C. A., ARRUDA, E. T. *et al.* Levantamento sorológico para CAEV em caprinos do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador, p. 50. Resumo.

CAPPUCCHIO, M. T., SANNA, E., SANNA, M. P., FARIGU, S., MINELLI, R. GUARDA, F. Maedi-visna virus detection in ovine third eyelids. *J. Comp. Pathol.*, 129(1): 37-43, 2003.

CASTRO, R.S. *Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1998. 128p. Tese (Doutorado em medicina Veterinária Preventiva).

CASTRO, R. S., GREENLAND, T., LEITE, R. C., GOUVEIA, A., MORNEX, J-F., CORDIER, G. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. Gen. Virol.*, 80: 1583-1589, 1999a.

CASTRO, R. S., LEITE, R. C., AZEVEDO, E. O., TABOSA, I. NASCIMENTO, S. A., OLIVEIRA, M. M. M., *et al.* Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e maedi-visna) em caprinos sem raça definida dos Estados de Pernambuco e Paraíba. In: XXVII CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, p. 84. Resumo. 2000.

CASTRO, R. S., LEITE, R. C., RESENDE, M., GOUVEIA, A. M. G. A labelled avidin-biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. *Vet. Res. Comm.*, 23: 515-522, 1999b.

CASTRO, R. S., LEITE, R. C., RESENDE, M., MARTINS, A., GOUVEIA, A. M. G. Caprine arthritis encephalitis virus isolation and identification using fluorescent antibody and polymerase chain reaction. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(3): 235-240, 1999c.

CELER Jr., V., CELER, V., NÉMCOVÁ, H., ZANONI, R. G., PETERHANS, E. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole vírus ELISA and AGID test. *J. Vet. Med. B*, 45: 183-188, 1998.

CHASTANG, J. *et al.* Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Pulmonaire, Service de Pneumologie, Hôpital Louis Pradel/Laboratoire Associé de Recherche sur les Lentivirus chez les Petits Ruminants, INRA-Ecole Vétérinaire de Lyon, France. (comunicação pessoal)

CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K., NARAYAN, O. 1996. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. *J. Gen. Virol.*, 77: 2037-2051.

CHEEVERS, W. P., KNOWLES, D. P., McGUIRE, T. C., CUNNINGHAM, D. R., ADAMS, D. S., GORHAM, J. R. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. *Lab. Inv.* 58: 510-517, 1988.

CHEEVERS, W. P., KNOWLES, D. P., NORTON, L. K. Neutralization-resistant antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. *J. Infect. Dis.*, 164(4):679-85, 1991

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

CHEEVERS, W., KNOWLES, D. P. Jr., NORTON, L. K. Neutralization-resistant antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. *J. Infect. Dis.*, 164:679-685, 1991.

CLEMENTS, J.E., PAYNE, S., Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. *Vir. Res.*, 32: 97-109, 1994.

COBRINIK, D., AIYAR, A., G. E, Z., KATZMAN, M., HUANG, H., LEIS, J. Overlapping retrovirus U5 sequence elements are required for efficient integration and initiation of reverse transcription. *J. Virol.*, 65(7): 3864-3872, 1991.

CORK, L. C., HADLOW, W. J., CRAWFORD, T. B., GORHAM, J. R., PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.*, 129(2): 134-141, 1974.

CORK, L. C., NARAYAN. O. The patogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of gotas. I. Persistent viral infection with progressive pathologic changes. *Lab. Inv.* 42(6): 562-596, 1980.

CRANE, S. E., KANDA, P., CLEMENTS, J. E. Identification of the fusion domain in the visna virus transmembrane protein. *Virology*, . 185: 488-492, 1991.

CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *JAVMA*, 178(7): 713-719, 1981.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; SANDE, R. D.; GORHAM, J. R.; HENSON, J. B. The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. *Am. J. Path.*, 100(2): 443-455, 1980.

CUNHA, R. G., NASCIMENTO, M. D. Ocorrência de anticorpos da artrite-encefalite caprina em soros de caprinos do Estado do Rio de Janeiro. *Rev. Brás. Méd. Vet.*, 17:72-75, 1995.

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

CUTLIP, R. C., LEHMKUHL, H. D., SCHMERR, M. J. F., BROGDEN, K. A. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet. Microbiol.*, 17: 237-250, 1988.

CUTLIP, R. C., LEHMKUL, H. D., JACKSON, T. A. Intrauterine transmission of ovine ovine progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.*, 42: 1795-1797, 1981.

DAHLBERG, J. E., GASKIN, J. M., PERK, K. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*, 39 (3): 914-919, 1981.

DAL PIZZOL, M., RAVAZZOLO, A. P., GONÇALVES, I. P. D., HOTZEL, I., FERANDES, J. C. T., MOOJEN, V. MAEDI-VISNA: identificação de ovinos infectados no Rio Grande do Sul, Brasil, 1987-1989. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 17: 65-76, 1989.

DALZIEL, R. G., HOPKINS, J., WATT, N. J., DUTIA, B. M., CLARKE, H. A. K., McCONNELL, I. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J. Gen. Vir.*, 72: 1905-1911, 1991.

de la CONCHA-BERMEJILLO, A., BRODIE, S. J., MAGNUS-CORRAL, S., BOWEN, R. A., DeMARTINI J.C. Pathologic and serological responses of

isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Human Retrovirol.* 8: 116- 123, 1995.

de la CONCHA-BERMEJILLO, A., MAGNUS-CORRAL, S., BRODIE, S. J., DeMARTINI, J. C. Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 684-688, 1996.

DeMARTINI, J. C., BRODIE, S. J., de la CONCHA-BERMEJILLO, A., ELLIS, J. A., ELLIS, J. A., LAIRMORE, M. D. Pathogenesis of lymphoid interstitial pneumonia in natural and experimental ovine lentivirus infection. *Clin. Infect. Dis.* , 17: 236-242, 1993.

DEZAN, C.P. *Levantamento epidemiológico em municípios do Triângulo Mineiro e Alto Parnaíba*. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 67p. 1996. (Monografia de Estágio Curricular)

DICKSON, J., ELLIS, T. Experimental caprine retrovirus infection in sheep. *Vet. Rec.*, 125: 649, 1989.

DOLF, G., RUFF, G. A DNA fingerprinting band associated with the susceptibility to CAE virus-induced arthritis in goats. *Brit. Vet. J.*, 150: 349-353., 1994.

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 Rum Res.*, 10: 251-262, 1993.

EAST, N. E., ROWE, J. D., MADEWELL, B. R., FLOYD, K. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 190:182-186, 1987.

EDELWEIS, G., TIGRE, M. D., NORONHA, P. R., QUEIROZ, M. F., CAMPOS S. G., SARDI, S. Ocorrência de anticorpos contra o vírus da artrite encefalite caprina em caprinos jovens de diferentes municípios do Estado da Bahia. In:

CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28, 2001, Salvador, p. 180. Resumo.

EIGEN, M., GARDNER, W., SCHUSTER, P., WINKLER-OSWATITSCH, R. The origin of genetic information. *Sci Am.*, 244: 88-118, 1981.

ELLIS, J. A., DeMARTINI, J. C. Immunomorphologic and morphometric changes in pulmonary lymph nodes of sheep with progressive pneumonia. *Vet Path.*, 22: 32-41, 1985.

ELLIS, J. A., RUSSEL, H. I., Du C. W. Effect of selected cytokines on the replication of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and ovine lentivirus pulmonary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40: 31-47, 1994.

FALCÃO, L. S. P. C. A., CAMPOS, K. M. T., CALLADO, A. K. C., CASTRO, R. S., OLIVEIRA, E. J. C., FALCÃO FILHO, M. C. A. *et al.* Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e maedi-visna) em ovinos santa inês do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador. Anais. Salvador, p. 50. Resumo.

FEINGOLD, K. R., KRAUSS, R. M., PANG, M., DOERRLER, W., JENSEN, P., GRUNFELD, C. The hyperglyceridemia of acquired immunodeficiency syndrome is associated with an increased prevalence of low density lipoprotein subclass pattern B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 76(6): 1423-1427, 1993.

FEVEREIRO, M., BARROS, S., FAGULHA, T. Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-visna vírus. *J. Virol. Meth.*, 81: 101-108, 1999.

FITERMAN, I.R. Constatação do complexo artrite-encefalite em um plantel de caprinos no Estado da Bahia. In: XXI CONGRESSO DE MEDICINA VETERERINÁRIA, p. 33, 1988. (Resumo)

GABUZDA, D. H., HESS, J.L., SMALL, J.A., CLEMENTS, J.E. Regulation of the visna virus long terminal repeat in macrophages involves cellular factors that bind sequences containing AP-1 sites. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2728-2733, 1989.

GARCIA, M., GALHARDO, M., ARAUJO, W.P., D'ANGELINO, J.L., BASTOS, P.S., ROSSINI, A.J. Caprine arthritis-encephalitis (CAE). Occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. *Trop. An. Health Prod.*, 24: 164, 1992.

GAZIT, A., SARID, R., MASHIAH, P., ARCHAMBAULT, D., DAHLBERG, J. E., TRONICK, S. R. *et al.* Defective viral particles in caprine arthritis encephalitis virus infection. *Viol.*, 189: 344-349, 1992.

GENDELMAN, H. E., NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S., GHOTBI, Z., CLEMENTS, J. E., STANLEY, J. *et al.* Tropism of sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.*, 58(1): 67-74, 1986.

GENDELMAN, H. E., NARAYAN, O., MOLINEAUX, S., CLEMENTS, J. E., GHOTBI, Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophages precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 7086-7090, 1985.

GENDELMAN, R., ORZECH, Y., MASHIAH, P., BIRENBAUM, M., GAZIT, A., YANIV, A. Productive replication of caprine arthritis-encephalitis virus is associated with induction of apoptosis. *J. Gen. Virol.*, 78: 801-805, 1997.

GOGOLEWSKI, R. P., ADAMS, D. S., McGUIRE, T. C., BANKS, K. L., CHEEVERS, W. P. Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and p15 proteins. *J. Gen. Virol.*, 66: 1233-1240, 1985.

GONZALEZ, L., GELABERT, J. L., MARCO, J. C., SAEZ-DE-OKARIZ, C. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. *Vet. Rec.*, 120: 102-109, 1987.

GREENWOOD, P. L. Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.*, 22: 71-87, 1995.

GRUNFELD, C., PANG, M., DOERRIER, W., SHIGENAGA, J. K., JENSEN, P., FEINGOLD, K. R. Lipids, lipoproteins, triglyceride clearance, and cytokines in human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 74(5) : 1045-1052, 1992.

GUDMUNDSSON, B., BJARNADOTTIR, H., KRISTJANSDDOTTIR, S., JONSSON, J. J. Quantitative assay for Maedi-visna virus genetic sequences and mRNA's based on RT-PCR with real-time FRET measurements. *Virology*, 307: 135-142, 2003.

GUIGUEN, F., LERONDELLE, C., FAVIER, C. Réponse du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre. *Ann. Rech. Vét.*, 21: 179-185, 1990.

GUIGUEN, F., MSELLI-LAKHAL, L., DURAND, J., DU, J., FAVIER, C., FORNAZERO, C. *et al.* Experimental infection of mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 61 (4): 456-461, 2000.

GUNN, G., STATT, A. W., MILNE, C. E. Economic impact of maedi-visna for commercial sheep flocks in Scotland. Poster in veterinary epidemiology and preventive medicine conference, Ennis, Republic of Ireland, March, 25-27., 1998.

HAASE, A. T., GARAPIN, A. C., FARAS, A. J., VARMUS, H. E., BISHOP, J. M. Characterization of the nucleic acid product of the visna virus RNA dependent DNA polymerase. *Virology*, 57: 251-258, 1974.

HADIGAN, C., MILLER, K., CORCORAN, C., ANDERSON, E., BASGOZ, N., GRINSPOON, S. Fasting hyperinsulinemia and changes in regional body composition in human immunodeficiency virus-infected women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(6): 1932-1937, 1999.

HAJELA, S. K., SHARMA, D. N., DWIVEDI, J. N. Isolation of cytopathogenic agent(s) from Maedi-affected lungs of sheep and goats in Indian. *Indian J. An. Sci.*, 45(6): 363-370, 1975.

HARMACHE, A., VITU, C., RUSSO, P., BOUYAC, M., HIEBLOT, C., PEVERI, P., *et al.* The caprine arthritis encephalitis *tat* gene is dispensable for efficient viral replication *in vitro* and *in vivo*. *J. Virol.*, 69(9): 5445-5454, 1995.

HECKERT, R. A., McNAB, W. B., RICHARDSON, S. M., BISCOE, M.R. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats serum. *Can. J. Vet. Res.* 56: 237-241, 1992.

HERMANN, L. M., CHEEVERS, W. P., MARSHALL, K. L., McGUIRE, T. C., HUTTON, M. M., LEWIS, G. S. *et al.* Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus a competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10(5): 862-865, 2003a.

HERMANN, L. M., CHEEVERS, W. P., McGUIRE, T. C., ADAMS, D. S., HUTTON, M. M., GAVIN, W. G. *et al.* Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 10(2): 267-271, 2003b.

HÖTZEL, I., BASTOS, E. S., RAVAZZOLO, A. P., MOOJEN, V. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 26(11): 1175-1179, 1993.

HOUWERS, D. J., GIELKENS A. L. J., van SCHAAKE Jr, J. 1982. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to maedi-visna virus. *Vet. Microbiol.* 7: 209-219.

HOUWERS, D. J., NAUTA, I. M. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. *Vet. Microb.*, 19: 127-139, 1989.

HOUWERS, D. J., SCHAAKE Jr, J.. An improved ELISA for detection of antibodies to ovine and caprine lentiviruses, employing monoclonal antibodies in one-step assay. *J. Immunol. Methods*. 98: 151-154, 1987

HOUWERS, D. J., van DER MOLEN, E. J. A five-year serological study of natural transmission of maedi-visna virus in a flock of sheep, completed with post mortem investigation. *J. Vet. Med. B*, 34: 421-431, 1987.

HULLINGER, G. A., KNOWLES, D. P., McGUIRE, T. C., CHEEVERS, W. P. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virology*, 192: 328-331, 1993.

HUSO, L.D., NARAYAN, O., HART, W. G. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *J. Virology*, 62: 1974-1980, 1988.

JOLLY, P. E., GANGOPADHYAY, A., CHEN, S., REDDY, P. G. WEISS, H. L., SAPP, W. J. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus. *Vet. Immun. Immunopath.*, 56: 97-106, 1997.

JOLLY, P. E., HUSO, P. L., SHEFFER, D., NARAYAN, O. Modulation of lentivirus replication by antibodies: Fc portion of immunoglobulins molecule is essential for enhancement of binding, internalization and neutralization of visna virus in macrophages. *J. Virology*, 63: 1811-1813, 1989.

JOLLY, P. E., NARAYAN, O. Evidence for interference, coinfections and intertypic virus enhancement of infection by ovine-caprine lentiviruses. *J. Virology*, 63(11): 4682-4688, 1989.

KARLSSON, I., ANTONSSON, L., SHI, Y., KARLSSON, A., ALBERT, J., LEITNER, T., *et al.* HIV virological variability unveiled: frequent isolation and chimeric receptors reveal unprecedented variation of coreceptor use. *AIDS*, 17(18): 2561-2569, 2003.

KEEN, J. E., KWANG, J. ROSATI, S.. Comparison of ovine lentivirus detection by conventional and recombinant serological methods. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 47: 295-309, 1995.

KEEN, J. E., KWANG, J., LITTLEDIKE, E. T., HUNGERFORD, L. L. Ovine lentivirus antibody detection in serum, colostrums and milk using a recombinant transmembrane protein ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 51: 253-275., 1996.

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

KENNEDY-STOSKOPF, S., NARAYAN, O., STRANDBERG, J. D. The mammary gland as a target organ for infection with caprine arthritis encephalitis virus. *J. Comp. Path.*, 95: 609-617, 1985.

KENNEDY-STOSKOPF, S., ZINK, C., NARAYAN, O. Pathogenesis of ovine lentivirus-induced arthritis: synovium and peripheral circulation. *Clin. Immun. Immunopathol.*, 52: 323-330, 1989.

KLEVJER-ANDERSON, P., CHEEVERS, W. P. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, 110: 113-119, 1981.

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

KNOWLES Jr, D. P., CHEEVERS, W. P. McGUIRE, T. C., BRASSIFIELD, A. L., HARWOOD, W. G., STEM, T. A. Structure and genetic variability of envelope

glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *J. Virol.*, 65(11): 5744-5750, 1991.

KNOWLES Jr, D. P., CHEEVERS, W. P. McGUIRE, T. C., STEM, T. A., GORHAM, J. Severity of arthritis is predicted by antibody response to gp135 in chronic infection with arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.*, 64(5): 2396-2398, 1990.

KNOWLES, D. P., EVERMANN, J. F., SHROPSHIRE, C., VANDERSCHALIE, J., BRADWAY, D., GEZON, H. M. *et al.* Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 243-245, 1994.

KRISTBJÖRNSDÓTTIR, H. B., ANDRÉSDÓTTIR, V., SVANSSON, V., TORSTEINSDÓTTIR, S., MATTHÍASDÓTTIR, S., ANDRÉSSON, Ò. S. The *vif* gene of maedi-visna vírus is essential for infectivity in vivo and in vitro. *Viol.* 318(1):350-359, 2004.

KWANG, J., CUTLIP, R. C. detection of antibodies to ovine lentivirus using a recombinant antigen derived from the *env* gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 183: 1040-1046, 1992.

KWANG, J., KEEN, J., CUTLIP, R. C., KIM, H. S., de la CONCHA-BERMEJILLO, A. Serological diagnosis of caprine lentivirus infection by recombinant immunoassay. *Small Rumin. Res.* 16: 171-177, 1995.

LAIRMORE, M. D., AKITA, G. Y., RUSSELL, H. I., DeMARTINI, J. C. Replication and cytopathic effects of ovine lentivirus strains in alveolar macrophages correlate with in vitro pathogenicity. *J. Virol.*, 61: 4038-4042, 1987.

LAIRMORE, M. D., BUTERA, S. T., CALLAHAN, G. N., DeMARTINI, J. C. Spontaneous interferon production by pulmonary leukocytes is associated with lentivirus-induced interstitial pneumonia. *J. Immun.*, 140(3): 779-785, 1988a.

LAIRMORE, M. D., POULSON, J. M., ADUCCI, T. A., DeMARTINI, J. C. Lentivirus-induced lymphoproliferative disease: comparative pathogenicity of phenotypically distinct ovine lentivirus strains. *Am. J. Path.*, 130(1): 80-90, 1988b.

LAMARA, A., FIENI, F., MSELLI-LAKHAL, L., TAINURIER, D., CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res.*, 79: 165-172, 2001.

LECHNER, F., MACHADO, J., BERTONI, G., SEOW, H. F., DOBBELAERE, D. A. E., PETERHANS, E. Caprine Arthritis Encephalitis Virus Dysregulates the Expression of Cytokines in Macrophages. *J. Virol.*, 71(10): 7488-7497, 1997.

LECHNER, F., VOGT, H.-R., SEOW, H. F., von BODUNGEN, U., BERTONI, G., ZURBRIGGEN, A. *et al.* Expression of TNF α in arthritis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Vet. Imm. Immunopath.*, 54: 281-289, 1996.

LEGASTELOIS, I., LEROUX, C., LEVREY, H., MORNEX, J.-F. Bases moléculaires des maladies liées aux lentivirus. *Cah. Agric.*, 5: 89-98, 1996.

LERONDELLE, C., FLEURY, C., VIALARD, J. La glande mammaire: organe cible de l'infection par la virus de l'arthrite et de l'encéphalite caprine. *Ann. Rech. Vét.*, 20: 57-64, 1989.

LERONDELLE, C., GODET, M., MORNEX, J.-F. Infection of primary cultures of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. *Vet. Res.*, 30: 467-474, 1999.

LEROUX, C., CHASTANG, J., GREELAND, T., MORNEX, J. F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, 142: 1125-1137, 1997a.

LEROUX, C., LERONDELLE, C., CHASTANG, J., MORNEX, J. F. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet. Res.*, 28(2): 115-121, 1997b.

LEROUX, C., VUILLERMOZ, S., MORNEX, J.-F., GREENLAND, T. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentivirus obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J. Gen. Virol.*, 76: 1533-1537, 1995.

LICHTENSTEIGER, C. A., CHEEVERS, W. P., DAVIS, W. C. CD8+ cytotoxic T-lymphocytes against antigenic variants of caprine arthritis encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 74: 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. *Vet. Path.*, 31: 695-703, 1994.

MacKENZIE, R. W., OLIVER, R. E., ROONEY, J. P., KAGEL, H. A successful attempt to raise goat kids free of infection with caprine arthritis encephalitis virus in an endemically infected goat herd. *New Zeland Vet. J.*, 35: 184-186, 1987.

MANSKY, L. M. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J. Gen. Virol.*, 79: 458-473, 1998.

MARSH, H. Progressive pneumonia in sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 62: 458-471, 1923.

McGUIRE, T. C., NORTON, L. K., O'ROUKE, K. I., CHEEVRES, W. P. Antigenic variation of neutralization sensitive epitopes of caprine arthritis-encephalitis lentivirus during persistent infection. *Viol.*, 62: 3488-3492. 1988.

MELO, A. C. M., FRANKE, C. R. Soroprevalência da artrite-encefalite caprina (CAE) no rebanho caprino leiteiro da região da Grande Fortaleza, Ceará, Brasil. *Ciênc. Rur.*, 27: 113-117, 1997

MELO, C. B., CASTRO, R. S., OLIVEIRA, A. A., FONTES, L. B., CALLADO, A. K. C., NASCIMENTO, S. A. *et al.* Estudo preliminar sobre a infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos e caprino em Sergipe. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador. Anais... Salvador, p. 47. Resumo.

MEYER, L., RABAUD, C., ZIEGLER, O., MAY, T., DROUIN, P. Protease inhibitors, diabetes mellitus and blood lipids. *Diab. Metab.*, 24(6) : 547-549, 1998.
MILCZEWSKI, V., SOTOMAIOR, C., REISCHAK, D., Von GROLL, A. Relato do primeiro isolamento do vírus Maedi-visna no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, 1997, Gramado. Anais. Gramado, p. 179. Resumo.

MITCHELL, D. T. Investigations into jaagziekte or chronic catarrhal pneumonia of sheep. *Dir. Vet. Educ. Res.*, 3rd and 4rd Report, Union of South África, p. 585, 1915.

MONLÉON, E., PACHECO, M. C., LUJÁN, L., BOLEA, R., LUCO, D. F., VARGAS, M. A. *et al.* Effect of in vitro maedi-visna virus infection on adherence and phagocytosis of staphylococci by ovine cells. *Vet. Microbiol.*, 57: 13-28, 1997.

MOOJEN, V., SOARES, H. C., RAVAZZOLO, A. P., PIZZOL, M., GOMES, M. Evidência de infecção pelo lentivirus (MAEDI/VISNA - Artrite encefalite Caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS*, 1.77-78, 1986.

MORIN, T., GUIGUEN, F., BOUZAR, B. A., VILLET, S., GREENLAND, T., GREZEL, D. *et al.* Clearance of a productive lentivirus infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.*, 77(11) : 6430-6437, 2003.

MORNEX, J.-F. The sheep model for human lung pathology. *Rev. Prat.*, 53(3): 241-244, 2003.

MORNEX, J.-F., LENA, P., LOIRE, R., COZON, G., GREENLAND, T., GUIGEN, F., *et al.* Lentivirus-induced interstitial lung disease: pulmonary pathology in sheep naturally infected by the visna-maedi virus. *Vet. Res.*, 25: 478-488, 1994.

MOTHA, M. X. J., RALSTON, J. C. Evaluation of ELISA for detection of antibodies to CAEV in milk. *Vet Microbiol.*, 38: 359-367, 1994.

MSELLI-LAKHAL, L., GUIGUEN, F., FORNAZERO, C., DU, J., FAVIER, C., DURAND, J. *et al.* Goat milk Epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Viol.*, 259: 67-73, 1999.

NAKAGAWA, M., MOTOI, Y., LIZUKA, M., AZUMA, R. Histopathology of enzootic chronic polyarthritis of goats in Japan. *Nat. Inst. An. Health Quaterly*, 11: 191-200, 1971.

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

NARAYAN, O., CLEMENTS, J. E., STRANDBERG, J. D., CORK, L. C., GRIFFIN, D. E. Biological characterization of the virus causing lekoencephalitis and arthritis in goats. *J. Gen. Virol.*, 50: 69-79, 1980.

NARAYAN, O., CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia , leukoencephalomyelitis and arthritis. *Rev. Infect. Dis.*, 7: 89-97, 1985.

NARAYAN, O., JOAG, S. V., CHEBLOUNE, Y., ZINK, M. C., CLEMENTS, J. E. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. *Viral Path.*, 1997, p. 657-668. Edited by N. NATHANSON. Lippincott-Raven, Philadelphia.

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. *Infect. Immun.*, 41: 67-73, 1983.

NARAYAN, O., SHEFFER, D., GRIFFIN, D. E., CLEMENTS, J. E., HESS, J. Lack of neutralizing antibody to caprine arthritis-encephalitis lentivirus in persistently infected goats can be overcome by immunization with inactivated *Mycobacterium tuberculosis*. *Viol.*, 49: 349-355, 1984.

NARAYAN, O., WOLINSKY, J. S., CLEMENTS, J. E., STRANDBERG, J. D., GRIFFIN, D. E., CORK, L. C. 1982. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. *J. Gen. Virol.*, 59:346-356.

NARAYAN, O., ZINK, M. C., GORRELL, M., McENTEE, M., SHARMA, D., ADAMS, R. Lentivirus induced arthritis in animals. *J. Rheumatol.* 19(32): 25-32., 1992.

NORD, K., ADNOY, T. Effects of infection by caprine arthritis-encephalitis virus on milk production of goats. *J. Dairy Sci.*, 80(10): 2391-2397, 1997.

NORMAN, S., SMITH, M. C. 1983. Caprine arthritis-encephalitis: review of the neurologic form in 30 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182: 1342-1345.

NUNEZ, E. A., CHRISSEFF, N. Steroid hormone, cytokine, lipid and metabolic disturbances in HIV infection. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, 8(4): 803-824, 1994.

OLIVEIRA, M. M. M., CASTRO, R. S., CARNEIRO, K. L., NASCIMENTO, S. A., CALLADO, A. K. C. *et al.* Anticorpos contra lentivirus de pequenos ruminantes (SRLV) em caprinos sem raça definida (SRD) e ovinos crioulos em abatedouros do Estado de Pernambuco. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador. Anais. Salvador, p. 51. Resumo.

OLIVER, R. E., CATHCART, A. McNIVEN, R., POOLE, W., ROBATI, G. Infection of lambs with CAEV by feeding milk from infected goats. *Vet. Rec.*, 19: 83, 1985.

OLIVER, R. E., GORHAM, J. R., PERRYMAN, L. E., SPENCER, G. R. Ovine progressive pneumonia: experimental intrathoracic, intracerebral and intra-articular infections. *Am. J. Vet. Res.*, 42(9): 1560-1564, 1981.

PASICK, J. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct Species or Quasispecies and its Implications for Laboratory Diagnosis. *Can. J. Vet. Res.*, 62: 241-244, 1998.

PEPIN, M., VITU, C., RUSSO, P., MORNEX, J.-F., PETERHANS, E. Maedi-visna virus infection in sheep: a review. *Vet. Res.*, 29(3-4): 341-367, 1998.

PEREIRA, M. F. *Artrite-encefalite caprina a vírus (CAE) - estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico em cabras naturalmente infectadas*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1995. 64p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

PÉRETZ, G., ASSO, J., DEVILLECHAISE, P. Le caev: revue des conséquences pratiques. *Revue Méd. Vét.*, 144(2): 93-98, 1993.

PINHEIRO, R. R., ALVES, F. S. F., GIRÃO, E. S., MEDEIROS, L. P., GIRÃO, R. N. Presença da artrite-encefalite caprina (CAEV) em Teresina, Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24, 1996, p. 161. Resumo.

PINHEIRO, R. R., EGITO, A. S., SANTA ROSA, J., PINHEIRO, A. A. Artrite-encefalite caprina viral (CAEV). Comunicado Técnico 19, Embrapa-CNPC, Sobral, CE, 1989. 5p.

POWER, C., RICHARDSON, S., BRISCOE, M., PASICK, J. evaluation of two recombinant maedi-visna virus proteins for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serum antibodies to ovine lentiviruses. *Clin. Diagn. Lab. Imm.*, 2: 631-633, 1995.

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. *Eur. J. Histochem.* 47(4): 373-378, 2003.

RAJYA, B. S., SINGH, C. M. The pathology of pneumonia and associated respiratory disease of sheep and goats. I. Occurrence of Jaagsiekte and Maedi in sheep and goats in India. *Am. J. Vet. Res.* 25:61-67, 1964.

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. *ENCONTRO DE VIROLOGIA*, 5, 1995, p. B-5.

REDDY, P. G., SAPP, W. J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 3042-3043, 1993.

REISCHAK, D. Lentivírus de pequenos ruminantes imunofluorescência utilizando isolados brasileiros para diagnóstico sorológico de infecção em ovinos e caprinos. Rio Grande do Sul: Faculdade de Veterinária da UFRGS, 132p., 2000. Dissertação.

REYBURN, T. H., ROY, J. D., BLACKLAWS, A. B., SARGAN, R. D., McCONNELL, I. Expression of maedi-visna virus major core protein p 25: development of a sensitive p25 antigen detection assay. *J. Virol. Meth.*, 37: 305-320, 1992a.

REYBURN, T. H., ROY, J. D., BLACKLAWS, A. B., SARGAN, R. D., WATT, J. N., McCONNELL, I. Characteristics of the T Cell-mediate immune response to Maedi-visna virus. *Viol.*, 191: 1009-1012, 1992b.

RIMSTAD, E., EAST, N., DEROCK, E., HIGGINS, J., PEDERSEN, N. C. Detection of to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant proteins. *Arch. Virol.* 134: 345-356, 1994.

RIMSTAD, E., EAST, N., TORTEN, M., HIGGINS, J., DEROCK, E., PEDERSEN, N. C. Delayed soroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am. J. Vet. Res.*, 54: 1858-1862, 1993.

ROSATI, S., KWANG, J., TOLARI, F. KEEN, J. E.. A comparison of whole virus and recombinant transmembrane ELISA and immunodiffusion for detection of ovine lentivirus antibodies in Italian sheep flocks. *Vet. Res. Commun.* 18: 73-80, 1994.

ROWE, J. D., EAST, N. E. Risk factors for transmission and methods for control of caprine Arthritis-Encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North A.: Food An. Pract.*, 13: 34-53, 1997.

ROWE, J. D., EAST, N. E., THURMOND, M. C., FRANTIL, C. E. Risk factors associated with caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairies. *Am. J. Vet. Res.*, 52: 510-514, 1991.

RUFF, G., LAZARY, S. Evidence for linkage between the caprine leucocyte antigen (CLA) system and susceptibility to CAE virus induced arthritis goats. *Immunogen.*, 28: 303-309, 1988.

RUSSO, P., VITU, C., BOURGOGNE, A., VIGNONI, M., ABADIE, G., DAVID, V. PÉPIN, M. Caprine Arthritis-Encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *Vet. Rec.*, 140: 483-484, 1997.

SANTIN, A. P. I., de BRITO, W. M. E. D., REISCHAK, D., BRITO, L. A. B. Artrite encefalite caprina: identificação de animais soropositivos no Estado de Goiás. *Ciênc. An. Bras.*, 3(1): 67-71, 2002.

SARAIVA NETO, A.O, CASTRO, R.S, BIRGEL E.H., NASCIMENTO, S.A. Estudo soro-epidemiológico da artrite-encefalite caprina em Pernambuco. *Pesq. Vet. Bras.*, 15: 121-124, 1995.

SCHOBORG, R. V., SALTARELLI, M. J., CLEMENTS, J. E. A *rev* protein is expressed in Caprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV)-infected cells and is required for efficient viral replication. *Viol.*, 202: 1-15, 1994.

SCHROEDER, B. A., OLIVER, R. E., CATHCART, A. The development and evaluation of an ELISA for detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *N. Z. Vet. J.*, 33: 213-219, 1985.

SEROUDE , V., AUDOLY, G., GLUSCHANKOF, P., SUZAN, M. Tryptophan 95, an Amino Acid Residue of the Caprine Arthritis Encephalitis Virus Vif Protein Which Is Essential for Virus Replication. *Viol.*, 280: 232-242, 2001.

SHAH, C., BONI, J., HUDER, J. B., VOGT, H-R., MÜHLHERR, J., ZANONI, R., *et al.* Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Viol.*, 319(1):12-26, 2004.

SHIH, D. S., CARRUTH, L. M., ANDERSON, M., CLEMENTS, J. E. Involvement of *fos* and *jun* in the activation of visna virus gene expression in macrophages through an AP-1 site in the viral LTR. *Viol.*, 190: 84-91, 1992.

SIGURDARDÓTTIR, B., THORMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of sheep affected with maedi. *J. Infect. Dis.*, 114: 55-60, 1964.

SIGURDSSON, B. Maedi: a slow progressive pneumonia progressive of sheep: an epizootiological and pathological study. *Brit. Vet. J.*, 110: 255-270, 1954.

SIGURDSSON, B., THOMAR, H., PÁLSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 10: 368-381, 1960.

SIHVONEN, L., NUOTIO, L., RIKULA, U., HIRVELÄ-KOSKI, V., KOKKONEN, U-M. Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev. Vet. Med.* , 47: 213-220, 2000.

SILVA, J. S., CASTRO, R. S., FEIJÓ, F. M. C., NASCIMENTO, S. A., OLIVEIRA, M. M. M., CALLADO, A. K. C. *et al.* Ocorrência de artrite encefalite caprina (CAEV) no município de Apodi-RN. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 28, 2001, Salvador, p. 180. Resumo.

SILVA, J. S., CASTRO, R. S., MELO, C. B., SILVA, J. B. A., FEIJÓ, F. M. C. Soroprevalência do vírus da artrite encefalite caprina em rebanhos caprinos leiteiros no Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador, p. 49. Resumo.

SIMARD, C., BRISCOE, M. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to maedi-visna virus in sheep. II. Comparison to conventional agar gel immunodiffusion test. *Can. J. Vet. Res.* 54: 451-456, 1990.

SIMIONI LEITE, B. L., MODOLO, J. R., CASTRO, R. S., STACCHINI, A. V. M., PADOVANI, C. R. Soroprevalência da artrite encefalite caprina a vírus, no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11, 2003, Salvador, p. 70. Resumo.

SINGH, D. K., CHEBLOUNE, Y., MSELLI-LAKHAL, L., KARR, B. M., NARAYAN, O. Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. *J. Gen. Virol.*, 80: 1437-1444, 1999.

SKRABAN, R., MATTHÍASDÓTTIR, S., TORSTEINSDÓTTIR, S., AGNARSDÓTTIR, G., GUDMUNDSSON, B., GEORGSSON, G., *et al.* Naturally occurring mutations within 39 amino acids in the envelope glycoprotein of maedi-visna virus alter the neutralization phenotype. *J. Virol.*, 73(10): 8064-8074, 1999.

SOTOMAIOR, C., MILCZEWSKI, V. Relato de um rebanho ovino infectado pelo vírus maedi-visna no Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25, Gramado, 1997. p. 179. Resumo.

SOUZA, G. J. G., ALVES, F. S. F. Inquérito sorológico preliminar sobre a artrite-encefalite caprina no Estado da Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA , 25, Porto Alegre., p. 179. 1999. Resumo.

STRAUB, O.C. Maedi-visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27(1): 1-5, 2004.

STRAUB, O.C. Über die Isolierung von Maedi/visna-virus (MVV) aus einem deutschen Schafbestand. *Berl Münch Tierärztl Wschr*, 83: 357-360, 1970.

STÜNZI, H., BÜCH, H. F., Le ROY, H. L., LEEMANN, W. Endemische arthritis chronica bei Ziege. *Schweizer Archiv Fürrur t-ierärkunden*, 106: 778-788, 1964.

SUTTON, K. A., LIN, C.-T., HARKISS, G. D., McCONNELL, I., SARGAN, D. R. Regulation of the long terminal repeat in visna virus by a transcription factor related to the AML/PEBP2/CBF superfamily. *Viol.*, 229: 240-250, 1997.

THORMAR, H. A. Comparison of visna and maedi viruses. I. Physical, chemical and biological properties. *Res. Vet. Sci.*, 6: 117, 1965.

THORMAR, H. A., HELGADOTTIR, H. A comparison of visna and maedi viruses. II. Serological relationships. *Res. Vet. Sci.* 6: 456-465, 1965.

TONG-STARKSEN, S. E., SEPP, T., PAGTAKHAN, A. S. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus long terminal repeat by gamma interferon. *J. Virol.*, 70(1): 595-599, 1996.

TORSTEINSDÓTTIR, S., AGNARSTDÓTTIR, G., MATTHÍASDÓTTIR, S., RAFNAR, B., ANDRÉSDÓTTIR, V., ANDRÉSSON, ÓS, *et al.* In vivo and in vitro infection with two different molecular clones of visna virus. *Viol.*, 229: 370-380, 1997.

TRAVASSOS, C. E., BENOIT, C., VALAS, S., SILVA, A. G., PERRIN, G., da SILVA, A. Detection of caprine arthritis encephalitis vírus in white blood

mononuclear cells and semen of experimentally infected bucks *Vet. Res.*, 29(6): 579-584, 1998.

TRAVASSOS, C. E., BENOIT, C., VALAS, S., SILVA, A. G., PERRIN, G. Caprine arthritis encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. *Small Rum. Res.*, 32(2): 101-106, 1999.

VALAS, S., BENOIT, C., BAUDRY, C., PERRIN, G., MAMOUN, R. Z. Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Virology*, 74(13): 6178-6185, 2000.

VALAS, S., BENOIT, C., GUIONAUD, C., PERRIN, G., MAMOUN, R. Z. North-american and French caprine arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology*, 237: 307-318, 1997.

VIGNE, R., FILIPPI, R., QUÉRAT, G., SAUZE, N., VITU, C., RUSSO, P. *et al.* Precursor polypeptides to structural proteins of visna virus. *Virology*, 42: 1046-1056, 1982.

VITU, C., RUSSO, P., FILIPPI, P., VIGNE, R., QUERAT, G., GIAUFFRET, A. Une technique ELISA pour la detection des anticorps anti-virus maedi-visna. Etude comparative avec l'immunodiffusion en gelose et la fixation du complement. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 5: 469-481, 1982.

WEINHOLD, E., MÜLLER, A., LEUCHTE, S. Visna-virus-ähnliche Partikel in der kultur vom Plexus chorioideus-Zellen einer Ziege mit visna-Symptomen. *Zbl. Vet. Med. B* 21: 32-36, 1974.

WERLING, D., LANHGHANS, W., GEARY, N. Caprine arthritis, encephalitis virus infection changes caprine blood monocytes responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. *Vet. Immune. Immunopath.* 43: 401-411, 1994.

WOODWARD, T. M., GASKIN, J. M., POULOS, P. W., MacKAY, R. J., BURRIDJE, M. J. Caprine arthritis-encephalitis: clinicopathologic study. *Am. J. Vet. Res.* 43: 2085-2096, 1982.

YANOVSKI, J. A., MILLER, K. D., KINO, T., FRIEDMAN, T. C., CHROUSOS, G. P., TSIGOS, C., *et al.* Endocrine and metabolic evaluation of human immunodeficiency virus-infected patients with evidence of protease inhibitor-associated lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(6): 1925-1931, 1999.

YILMA, T., OWENS, S., ADAMS, D. S. High levels of interferon in synovial fluid of retrovirus-infected goats. *J. Interf. Res.* 8: 45-50, 1988.

ZANONI, R. G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 79: 1951-1961, 1998.

ZANONI, R. G.;KRIEG, A., PETERHANS, E. detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus by protein G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and immunoblotting. *J. Clinical Microbiol.* 27: 580-582, 1989.

ZHANG, Z., WATT, N. J., HOPKINS, J., HARKISS, G., WOODALL, C. J. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Virol. Meth.*, 86: 13-20, 2000.

ZINK, M. C., NARAYAN, O., KENNEDY, P. G. E., CLEMENTS, J. E. Pathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis-encephalitis: new leads on the mechanism of restricted virus replication and persistent inflammation. *Vet. Immun. Immunopath.*, 15: 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. *Am. J. Path.*, 136(4): 843-854, 1990.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

A seguir estão apresentados, em capítulos, os resultados correspondentes a trabalhos completos que serão publicados em periódicos científicos especializados.

4.1. Capítulo 1

Título: Otimização do aproveitamento de explantes de membrana sinovial caprina na cultura primária de células destinada à pesquisa de lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV).

Autores: CALLADO, A.K.C., CASTRO, R.S., NASCIMENTO, S.A., FALCÃO, L.S.P. C.A., TINÉ, E., BENEVIDES, R., LIMA, V.L.M.

Fonte de publicação: Journal of Virological Methods

Fator de impacto: 1,768

4.2. Capítulo 2

Título: Avaliação da replicação de amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes em culturas de células de membrana sinovial.

Autores: CALLADO, A.K.C., CASTRO, R.S., BENEVIDES, R., ALENCAR, C.A.S., FALCÃO, L.S.P.C.A., NASCIMENTO, S.A., TINÉ, E., LIMA, V.L.M.

Fonte de publicação: Small Ruminant Research

Fator de impacto: 0,396

4.3. Capítulo 3

Título: Levantamento soroepidemiológico de lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos do Estado de Pernambuco.

Autores: CALLADO, A.K.C., CASTRO, R.S., FALCÃO, L.S.P.C.A., OLIVEIRA, E.J.C., FALCÃO, M.C.A., NASCIMENTO, S.A., CAMPOS, K.M.T., TINÉ, E., LIMA, V.L.M.

Fonte de publicação: Journal of Veterinary Medicine B

Fator de impacto: 0,676

4.4. Capítulo 4

Título: Influence of caprine arthritis-encephalitis vírus (CAEV) on lipids profile from serum of goats naturally infected.

Autores: CALLADO, A.K.C., CASTRO, R.S., FALCÃO, L.S.P.C.A., OLIVEIRA, E.J.C., LIMA, V.L.M.

Fonte de publicação: American Journal of Veterinary Research

Fator de impacto:

CAPÍTULO 1

“OTIMIZAÇÃO DO APROVEITAMENTO DE EXPLANTES DE MEMBRANA SINOVIAL CAPRINA NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DESTINADAS À PESQUISA DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (SRLV)”

Trabalho a ser submetido ao periódico

Journal of Virological Methods.

Fator de impacto: 1,768

REAPROVEITAMENTO DE EXPLANTES DE MEMBRANA SINOVIAL CAPRINA NA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS DESTINADA À PESQUISA DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (SRLV).

CALLADO, A.K.C.¹, CASTRO, R.S.³, NASCIMENTO, S.A.³, FALCÃO, L.S.P. C.A.³, TINÉ, E.³, BENEVIDES, R.⁴, LIMA, V.L.M.²

¹ Laboratório de Apoio Animal do MARA – LAPA/RECIFE.. Recife, PE.

² Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica. Recife-PE.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina Veterinária. Recife-PE.

⁴ Médica Veterinária.

Resumo:

As culturas celulares são rotineiramente utilizadas para a produção de proteínas para diagnóstico ou para fins terapêuticos. O cultivo primário de células da membrana sinovial é amplamente utilizado para isolamento, identificação, propagação, titulação e detecção de anticorpos neutralizantes de lentivirus de pequenos ruminantes. Entretanto, estas células apresentam limitada capacidade de divisão *in vitro*. Este trabalho descreve o reaproveitamento de explantes de membrana sinovial caprina para obtenção de sucessivas culturas primárias de células de membrana sinovial na primeira passagem oriundas de explantes de um único animal. Os explantes puderam ser reaproveitados e utilizados por seis vezes. Todas as seis culturas de células primárias obtidas mantiveram-se em níveis satisfatórios de produtividade e permissividade à replicação de amostras de lentivírus de pequenos ruminantes por mais de 25 subcultivos.

Palavras-chave: CAEV, membrana sinovial, replicação viral, cultura primária.

1. Introdução

Os pequenos ruminantes podem ser infectados por um grupo de lentivírus, genericamente denominados de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (SRLV), que compreende vários isolados distribuídos, basicamente, em dois grupos filogenéticos, cujos protótipos são os vírus Maedi-Visna (MVV) e Artrite-encefalite Caprina (CAEV), que causam doenças degenerativas progressivas lentas, ocasionando importantes perdas econômicas (Castro *et al.* 1999).

Os SRLV infectam células do sistema fagocítico-mononuclear *in vivo*. Por outro lado, *in vitro* o vírus se reproduz em células da membrana sinovial (Crawford *et al.*, 1980; Dahlberg *et al.*, 1981; Klevjer-Anderson & Cheevers, 1981; Cheublone *et al.*, 1996), macrófagos, plexo coróide, pulmão, rim (Klevjer-Anderson & Cheevers, 1981), córnea (Barban *et al.*, 1984; Kirkland & Batty, 1987), células do músculo liso aórtico (Leroux *et al.*, 1995) e células epiteliais da glândula mamária (Mselli-Lakhal, 1999).

As culturas celulares são rotineiramente utilizadas na biotecnologia para, dentre outras coisas, produção de proteínas para diagnóstico. O cultivo primário de células da membrana sinovial é amplamente utilizado para isolamento, identificação, propagação, titulação e detecção de anticorpos neutralizantes de SRLV (Crawford *et al.*, 1980; Cheublone *et al.*, 1996; Abreu *et al.*, 1998; Callado *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 1999). Além disto, as culturas de células de membrana sinovial têm sido amplamente utilizadas para ampliação de estoques virais com potencial uso para a produção de vacinas (Zhang *et al.*, 2003). Entretanto, estas células apresentam limitada capacidade de divisão em cultura e após aproximadamente 25 passagens atingem estado de senescência celular ou de não-proliferação, sendo necessária a obtenção de novos fetos para reinício das culturas celulares. Já foram desenvolvidas células fibroblásticas imortalizadas permissíveis a replicação de SRLV (Teixeira *et al.*, 1997), entretanto, estas células ainda não estão disponíveis para comercialização.

Este trabalho teve como objetivo a otimização do aproveitamento de explantes de membrana sinovial de fetos caprinos para ampliação do número de culturas primárias.

2. Material e métodos

As células de membrana sinovial (MS) foram obtidas de fetos caprinos soronegativo para SRLV (Abreu *et al.*, 1998; Callado *et al.*, 1999). As culturas de explantes foram estabelecidas como segue: articulações intercarpais de ambos os membros foram assepticamente abertas e a membrana sinovial obtida com mínimo tecido periarticular, através de dissecação cuidadosa. As membranas foram umedecidas com Meio Essencial Mínimo [MEM-Eagle com penicilina, estreptomicina e anfotericina B], acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB), seccionadas em fragmentos de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro e colocados em garrafas de cultivo de 25 cm², incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após aproximadamente 30 minutos, foi adicionado 2,0 mL de MEM, suficientes para cobrir os explantes. Passados cinco dias, quando foram evidenciados adesão e crescimento celular, os fragmentos foram removidos e transferidos para outra garrafa. A remoção dos fragmentos e a transferência dos explantes foram sucessivamente realizadas. As células foram rotineiramente subcultivadas após tripsinizações (associação tripsina a 0,2% e ácido etileno diamino tetracético a 0,02% em PBS), com intervalo de sete dias, na proporção de 1:3 e mantidas em MEM acrescido de 10% de SFB.

A sensibilidade das células da membrana sinovial à infecção por lentivírus foi estabelecida utilizando duas amostras de SRLV: CAEV Cork (Cork *et al.*, 1974) e Maedi-Visna K1514 (Sigurdsson *et al.*, 1960). As monocamadas de MS Caprina subconfluentes foram inicialmente infectadas com 1ml (por garrafa de 75 cm²) da suspensão original, estocada em N₂ líquido, diluída 1:5. Após 1 hora a 37 °C o inóculo foi removido e substituído por 25 mL de MEM contendo 2% de SFB. As células foram avaliadas diariamente para observação do aparecimento de sincício durante 30 dias, após o qual as garrafas foram coradas para avaliação qualitativa, com base no efeito citopático, da replicação viral. Os sobrenadantes das culturas infectadas foram colhidos com intervalo de 7 dias.

Para a produção de antígeno para o teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) após o descongelamento foi feito um pool de sobrenadante das monocamadas infectadas com a mesma amostra. O sobrenadante foi

centrifugado a $3.300 \times g$ durante 30 minutos, removido e dialisado em membrana de diálise de 33 X 21 mm (INLAB-Ind. Bras.) contra PEG 8.000 (10%) em PBS, a 4 °C, durante 48 a 72 h, até concentrá-lo cerca de 50 vezes, quando foi colhido e estocado a 4 °C .

Para o teste de IDGA, o gel de agar foi dissolvido e adicionado 16 mL em placas de Petri de plástico, com 90 mm de diâmetro. Após a solidificação, o gel foi perfurado com um molde em forma de roseta, de maneira a formar sete poços de oito mm de diâmetro e três mm de distância entre as bordas, sendo um central onde foi colocado soro padrão positivo, e seis periféricos onde foram colocados os antígenos teste e de referência alternadamente. A leitura foi realizada com 72 horas. Considerou-se como reação positiva aquela que formou uma linha de precipitação entre o poço do antígeno e o do soro teste e negativos a ausência dessa linha.

3. Resultados e discussão

A obtenção de monocamadas de células a partir do aproveitamento dos explantes de MS dos carpos de 4 fetos caprinos forneceu 8 garrafas para início de cultura celular primária de 25 cm^2 de área de cultivo por feto. A metodologia convencionalmente utilizada (Crawford *et al.*, 1980; Dahlberg *et al.*, 1981; Klevjer-Anderson & Cheevers, 1981; Abreu, 1998; Castro *et al.*, 1999; Callado *et al.*, 1999) permite a obtenção de apenas 2 garrafas de cultura celular de 25 cm^2 de área de cultivo por cada um dos dois carpos do feto, pois após o estabelecimento da nova monocamada os fragmentos dos explantes eram removidos e descartados. O melhor rendimento da metodologia com o aproveitamento dos explantes é de significativa importância considerando-se as dificuldades na obtenção de fetos no matadouro, no processamento, na manutenção e no congelamento de células primárias além dos riscos da introdução de agentes infecciosos na manipulação de material proveniente de matadouro.

Um fator limitante para o melhor rendimento da produção celular através do aproveitamento dos explantes foi o tamanho dos fragmentos. Os fragmentos menores foram perdidos durante a remoção e transferências sucessivas.

O cultivo *in vitro* de células animais no estágio embrionário ou adulto oriundas de um amplo espectro de tecidos pode ser realizado por um período de tempo variável (Burleson *et al.*, 1992). O cultivo de células aderentes é formado pela fixação das células à superfície de contato, estabelecendo uma camada contínua que cobre toda a superfície de cultivo, em geral, com a espessura de uma célula, denominada monocamada. O cultivo pode afetar as características morfológicas e bioquímicas devido às condições usadas para estabelecer e manter as culturas. Portanto, as células estabelecidas resultam da população de células que se adaptaram melhor às condições de cultivo.

Quanto ao número de passagens, sabe-se que células em alta passagem podem reduzir a eficiência na replicação viral. O desejável é a utilização das células em baixa passagem (4 a 8 passagens) para a produção de partículas virais. Os explantes foram removidos e transferidos para outra garrafa por seis vezes, obtendo-se, desta forma, células primárias em diferentes passagens no mesmo intervalo de tempo, possibilitando a sua utilização para replicação viral ainda nas primeiras passagens, mesmo após cerca de 50 dias pós-coleta dos fetos no matadouro.

As células obtidas otimização do aproveitamento dos explantes foram rotineiramente subcultivadas por mais de 25 vezes após tripsinizações e mantiveram-se em níveis satisfatórios de vitalidade e produtividade. Resultados similares de vitalidade e produtividade celular foram descritos por Abreu *et al.* (1998) e Callado *et al.* (1999). O restabelecimento de nova monocamada a cada 5 dias foi obtido com suspensão de células de 5×10^5 células/mL. As células foram permissivas à replicação de SRLV em todas as 25 passagens. A avaliação da replicação viral baseada na pesquisa de efeito citopático revelou a presença de sincícios com mais de trinta núcleos, como previamente descrito (Abreu *et al.*, 1998; Callado *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 1999) (Figura 1). O sobrenadante destas culturas foi coletado até que as monocamadas fossem destruídas, com rendimento de 4 coletas no intervalo de 7 dias. As culturas infectas se mantiveram por trinta dias, aproximadamente, como previamente descrito (Abreu, 1998). O sobrenadante produzido foi utilizado para a produção de antígenos

virais para o teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) e ensaios imunoenzimáticos. Os antígenos produzidos foram eficientes no reconhecimento de soros padrões forte e fracamente positivos.

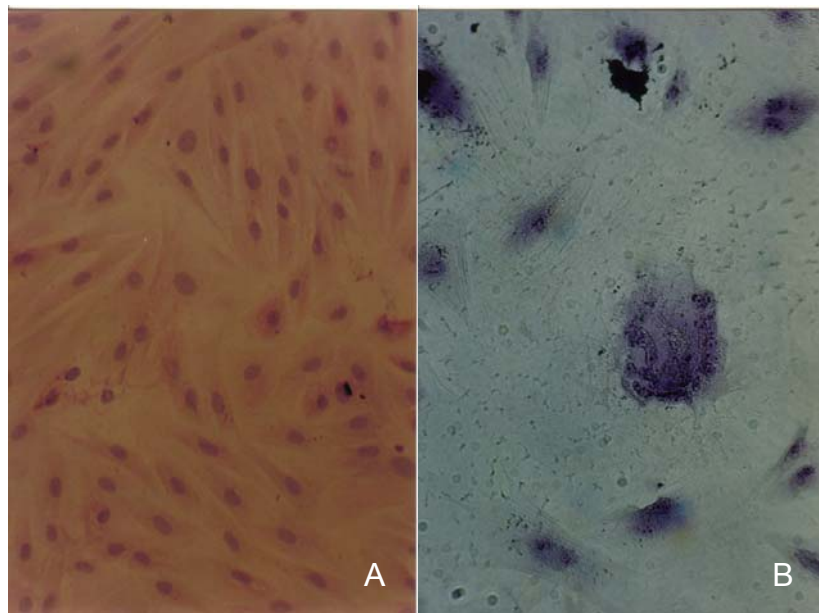


Figura 1 – Monocamadas de membrana sinovial caprina coradas pelo corante de Giemsa (100 x): A – Monocamada não infectada. B – Monocamada infectada.

4. Referências bibliográficas

- Abreu, S. R. O., Castro, R. S., Nascimento, S. A., Souza, M. G. 1998. CAEV nucleoproteic antigen production and comparison with Maedi-Visna antigen in the immunodiffusion test. *Braz. J. Vet. Res.* 18(2):57-60.
- Barban, V., Quérat, G., Sauze, N., Filippi, P., Vigne, R., Russo, P.; Vitu, C. 1984. Lentiviruses are naturally resident in a latent form in long-term ovine fibroblast cultures. *Journal of Virology*, 52(2): 680-682.
- Burleson, F.G., Chambers, T. M., Wiedbrauk, D.L. *Virology: A laboratory manual*, New York: Academic Press, Inc., 1992, p. 8-15.
- Callado, A.K.C., Castro, R.S., Nascimento, S.A., Silva-Rodrigues, M.I.M., Pinto-Júnior, J.H. & Teixeira, M.F.S. 1999. Preliminary characterization of the infection of synovial membrane cells by Brazilian samples of small ruminants lentiviruses. *Ciência Vet. Trop.*, 2(3): 152-159.
- Castro, R.S., Leite, R.C., Resende, M., Martins, A., Gouveia, A.M.G. 1999. Caprine arthritis encephalitis virus isolation and identification using fluorescent antibody and polymerase chain reaction. *Arq. Bras. Med. Vet.*, 51(3): 235-240.
- Chebloune , Y., Sheffer, D., Karr, B. M., Stephens, E., Narayan, O. 1996. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentivirus in ovine fibroblast cell cultures. *Virology*, v. 222, p. 21-30.
- Cork, L. C., Hadlow, W. J., Crawford, T. B., Gorham, J. R., Piper, R. C. 1974. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *Journal of Infectious Diseases*, 129(2): 134-141.
- Crawford, T. B., Adams, D. S., Cheevers, W. P., Cork, L. C. 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207: 997-999.
- Dahlberg , J.E., Gaskin, J. M., Perk, K. 1981. Morphological and immunological comparison of caprine arthritis-encephalitis and ovine progressive pneumonia viruses. *J. Virol.*, 39 (3): 914-919.
- Kirkland, P. D., Batty, E. M. 1987. Caprine arthritis-encephalitis virus: an efficient method for the large scale production of serological antigens. *J. Virol. Methods*, 16: 323-326.

- Klevjer-Anderson, P., Cheevers, W. P. 1981. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology*, 110:113-119.
- Leroux, C., Cordier, G., Mercier, I., Chastang, J., Lyon, M., Quérat, G., Greenland, t., Vigne, r., Mornex, J.-F. 1995. ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna virus in vitro. *Arch. Virol.*, 140: 1-11.
- Mselli-Lakhal, I., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, S., Mornex, J.-F., Chebloune, Y. 1999. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. *Virology*, 259: 67-73.
- Sigurdsson, B., Thormar, H., Pálsson, P. A. 1960. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch. Virusforsch.*, 10: 368-381.
- Teixeira, M. F. S., Veronique, L., Mselli-Lakahl, L., Chettab, A., Chebloune, Y., Mornex, J. F. 1997. immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *American Journal of Veterinary Research*, 58(6): 579-584.
- Zhang, Z., Guo, J., Ni, Y., Bazer, F. W., Giavedoni, L., de la Concha-Bermejillo, A. 2003. Construction and characterization of a recombinant ovine lentivirus carrying the optimized green fluorescent protein gene at the dUTPase locus. *Arch. Virol.*, 148(8): 1485-1506.

CAPÍTULO 2

**“AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DE AMOSTRAS BRASILEIRAS DE
LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM CULTURAS DE CÉLULAS DE
MEMBRANA SINOVIAL”**

Trabalho a ser submetido ao periódico
Small Ruminant Research.
Fator de impacto: 0,396

AVALIAÇÃO DA REPLICAÇÃO DE AMOSTRAS BRASILEIRAS DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM CULTURAS DE CÉLULAS DE MEMBRANA SINOVIAL.

CALLADO, A.K.C.¹, CASTRO, R.S.³, BENEVIDES, R.³, ALENCAR, C.A.S.¹, FALCÃO, L.S.P.C.A.³, NASCIMENTO, S.A.³, TINÉ, E.³, LIMA, V.L.M.²

¹ Laboratório de Apoio Animal do MARA – LAPA/RECIFE.. Recife, PE.

² Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica. Recife-PE.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina Veterinária. Recife-PE.

⁴ Médico Veterinário.

Resumo

Foi relatado o isolamento e a caracterização biológica e molecular de amostras brasileiras de SRLV de caprinos dos Estados de Minas Gerais (BrMg2-03) e Pernambuco (BrPe1-01) com o mesmo fenótipo em cultivo celular e grupos filogenético diferentes. Para aprofundar o conhecimento destas diferenças foi feito estudo para caracterização da infecção de células de membrana sinovial (MS) caprina e ovina pelas amostras BrPe1-01 e BrMg2-03, de forma comparativa com as amostras CAEV Cork e Maedi-Visna K1514. Não se obteve efeito citopático compatível com os inicialmente descritos nas várias tentativas de replicação, utilizando-se suspensão originalmente diluída, sem diluição posterior, com passagem intervalada de sete dias ou mesmo após 60 dias em cultivo com células homólogas ou heterólogas. As amostras BrPe1-01 e BrMg2-03 produziram efeito citopático típico, porém pouco intenso. Não foram detectados antígenos através do teste de IDGA. Entretanto, no teste de ELISA revelou a presença de antígenos. Estes resultados sugerem que pode ter havido restrição na replicação viral no sistema celular utilizado.

Palavras-chave: lentivírus de pequenos ruminantes, cultivo, replicação restrita.

1. Introdução

Os SRLV pertencentes à família Retroviridae, causam doença progressiva multissistêmica, afetando principalmente pulmões, articulações, úbere e sistema nervoso central de caprinos e ovinos (Narayan *et al.*, 1997). Uma propriedade comum dos SRLV é a persistência no animal mesmo na presença de resposta imunológica, devido à restrição da replicação viral. *In vivo*, a infecção por SRLV está restrita a células do sistema fagocítico mononuclear (Gendelman *et al.*, 1986). Células dendríticas também são infectadas e são responsáveis pelo transporte do vírus até os linfonodos, onde estas são responsáveis pela infecção de macrófagos, na presença de linfócitos T (Eriksson *et al.*, 1999). A restrição *in vivo* geralmente é superada *in vitro* pela explantação de tecidos dos órgãos-alvo de animais infectados, que permite o início da replicação viral, liberação de partículas para o meio extracelular e indução de efeito citopático nas células infectadas (Crawford *et al.*, 1980). Entretanto, restrição à replicação lentiviral também pode ser observada em culturas celulares (Klevjer-Anderson and Cheevers, 1981; Barban *et al.*, 1984).

A presença de SRLV tem sido registrada em diferentes países (OIE/FAO, 1996) inclusive no Brasil, onde existem estudos relatando seu isolamento e identificação (Hötzel *et al.*, 1993; Moojen *et al.*, 1995; Abreu, 1998; Milczewski *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 1999c), bem como estudos filogenéticos, que demonstraram a existência de três amostras caprina (BrMg1-01, BrMg1-02 e BrMg2-03), filogeneticamente mais próximas de CAEV Cork e uma amostra (BrPe1-01) mais próxima de Maedi-Visna K1514 (Castro *et al.*, 1999a).

2. Material e métodos

2.1. Cultura celular

As células de membrana sinovial (MS) foram obtidas de fetos caprino e ovino soronegativos para SRLV (Abreu *et al.*, 1998). As culturas de explantes foram estabelecidas como segue: articulações intercarpais de ambos os membros foram assepticamente abertas e a membrana sinovial obtida com mínimo tecido periarticular, através de dissecação cuidadosa. As membranas

foram umedecidas com Meio Essencial Mínimo [MEM-Eagle com penicilina, estreptomicina e anfotericina B], acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB), seccionadas em fragmentos de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro e colocados em garrafas de cultivo de 25 cm², incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após aproximadamente 30 minutos, foi adicionado 2 mL de MEM, suficientes para cobrir os explantes. Passados sete dias, quando foram evidenciados adesão e crescimento celular, os fragmentos foram removidos e transferidos para outra garrafa, com produção final de três garrafas de 25 cm². Após 14 dias de cultivo, as células foram rotineiramente subcultivadas após tripsinizações (solução tripsina a 0,2% e ácido etileno diamino tetracético à 0,05%), com intervalo de sete dias, na proporção de 1:3 e mantidas em MEM acrescido de 10% de SFB. Estas células foram usadas até 15 subculturas. A concentração celular foi determinada, em hemocitometro, pela contagem das células.

2.2. Infecção das células por vírus

A sensibilidade das células da membrana sinovial à infecção por lentivírus foi estabelecida utilizando 4 amostras de SRLV: a) CAEV Cork: obtida a partir de cultura de explante de timo de caprino que tinha sido inoculado à 6 semanas com suspensão cerebral proveniente de caprino afetado naturalmente (Cork *et al.*, 1974).; b) Maedi-Visna K1514: originalmente obtida de ovino com Visna induzida experimentalmente na Islândia (Sigurdsson *et al.*, 1960); c) BrPe1-01: isolada a partir de explante de MS de caprino com desconforto respiratório proveniente do Estado de Pernambuco (Castro *et al.*, 1999a); e d) BrMg2-03: isolada a partir de explante de MS de caprino com artrite proveniente do Estado de Minas Gerais (Castro *et al.*, 1999a).

Para a ampliação do estoque viral, as monocamadas de MS subconfluentes, caprina e ovina, foram inicialmente infectadas com 1 mL (por garrafa de 25 cm²) da suspensão viral original, estocada em N₂ líquido, diluída 1:5. Após 1 hora a 37 °C, o inóculo foi removido e substituído por 5 mL de MEM contendo 2% de SFB. Foram colhidos sobrenadantes com intervalos de sete dias, durante 30 dias, após o qual as garrafas foram coradas para avaliação qualitativa, com base no efeito citopático, da replicação viral. O sobrenadante

colhido de cada amostra viral foi utilizado para inocular monocamadas subconfluentes (0,2 ml por garrafa de 25 cm²) que foram cultivadas por 60 dias e/ou armazenado a -20 °C para posterior produção de antígeno.

Em outro experimento, a suspensão viral original foi usada diretamente no meio de cultura, sem diluir, fazendo-se passagens com intervalo de sete dias das monocamadas inoculadas. Durante as passagens, as células infectadas eram mantidas em MEM suplementado com 10% de SFB, por 24 horas, seguido por manutenção em MEM suplementado com 2% de SFB.

2.3. Titulação viral em monocamadas

As microplacas de 96 poços foi adicionado um volume inicial de 50 µL de MEM, acrescido de 50 µL da diluição seriada (ao décimo de 10⁻¹ a 10⁻⁷) do sobrenadante das culturas e 100 µl da suspensão de células (2 x 10⁵/ml). Aos quatorze dias de incubação, o efeito citopático da replicação viral foi pesquisado e as monocamadas coradas com corante Giemsa. Os poços foram classificados como positivos (presença de pelo menos um sincício contendo quatro núcleos) ou como negativos. Os títulos virais foram expressos como 50% da dose infectante para cultivo de tecido (TCID₅₀/0,05 ml), calculados de acordo com o método de Reed and Muench (1938).

2.4. Imunodifusão em gel de Agar

Após descongelamento, o sobrenadante das amostras CAEV Cork, BrPe1-01 e BrMg2-03, foi colocado em membrana de diálise de 33 X 21 mm (INLAB-Ind. Bras.) e dialisado contra PBS 0,5 M, pH 7,4 contendo PEG 8.000 a 10%, a 4 °C, durante 48 a 72 h, até concentrá-lo cerca de 100 vezes, quando foi removido e estocado a 4 °C, como previamente descrito (Abreu *et al.*, 1998, Castro *et al.*, 1999b). O teste foi processado em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, contendo 16 mL do gel de agar preparado com 1,2 % de agar noble (Difco), 2 g de NaOH, 9 g de H₃BO₃ e 1 L H₂O. O gel foi perfurado com um molde em forma de roseta, de maneira a formar sete poços de 8 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre as bordas, sendo um central, onde foi colocado soro padrão

positivo para Maedi-Visna (Institut Pourquier - Montpellier, França) e outros seis distribuídos ao redor deste, onde foram alternados antígeno Maedi-Visna (Institut Pourquier - Montpellier, França) e concentrados dos sobrenadantes de células infectadas com as amostras CAEV Cork, BrPe1-01 e BrMg2-03, respectivamente.

2.5. EIE

Os testes foram realizados utilizando-se 100µl de cada componente da reação (Castro *et al.*, 1999b). A diluição do antígeno captura foi feita em tampão carbonato/bicarbonato (0,05 M; pH 9,6). Os soros e conjugados foram diluídos em PBS (com 0,5% de tween 20, e 1% de ovoalbumina GII). Como substrato da peroxidase foi utilizado H₂O₂ (30% em diluição final 1:1.150) em tampão citrato-fosfato (0,1 M; pH 5,0). As placas foram lavadas cinco vezes entre cada etapa da reação com salina 0,85% adicionada de 0,5% de tween 20.

Após o descongelamento das placas foi realizada a distribuição dos soros padrões na proporção de 1/50. Após uma hora de incubação a 37 °C, em estufa com agitador de placas (Titer Plate Shaker, Lab-Line instruments, USA), procedeu-se a distribuição do conjugado (Sigma, USA) anti-ovino, marcado com peroxidase (ELISA-I). Depois da incubação por uma hora foi feita a distribuição de: a) estreptavidina conjugada com peroxidase (Sigma, USA) (LAB-ELISA); b) substrato (10 µl de H₂O₂ e 10 mg de OPD; Sigma, USA), incubação por 15 minutos em câmara escura, bloqueio da reação por adição de H₂SO₄ (3N) e leitura da intensidade de reação em espectrofotômetro (MS LABSYSTEM, USA) com filtro 492 nm de comprimento de onda (Castro *et al.*, 1999b).

3. Resultados

As células de cultura primária MS mantiveram-se em níveis satisfatórios de vitalidade, produtividade e permissividade à replicação das amostras padrão de SRLV por mais de 14 subcultivos, como previamente observado por Abreu *et al.* (1998) e Callado *et al.* (1999). Apesar disto, a utilização das células limitou-se às primeiras passagens (a partir da quarta), considerando-se que células em alta passagem poderiam reduzir eficiência na replicação viral.

As amostras brasileiras, BrPe1-01 e BrMg2-03, identificadas por imunofluorescência, PCR, inclusive com clonagem e seqüenciamento de parte do genoma, replicaram bem nas células autólogas (próprio animal), com formação de sincícios na primeira semana de cultivo, sendo preliminarmente caracterizadas como líticas (Castro *et al.*, 1999a,c). Quando inoculadas em células de MS homóloga (caprina) ou heteróloga (ovina), produziu efeito citopático, com vacuolização e formação de sincícios (Figura 1), porém com baixo título viral no meio de cultura (Figura 2) nas várias tentativas de aumentar o título, avaliado com base no efeito citopático, utilizando-se suspensão original diluída (1:5) ou não, mesmo após 60 dias em cultivo ou 30 dias com 3 subcultivos em intervalados de sete dias apresentaram resultados similares aos demonstrados na figura 2. A avaliação do efeito citopático revelou a presença de sincícios, geralmente de poucos núcleos, em pequena quantidade e de difícil visualização nas camadas não coradas, da mesma maneira que observado por Coakley *et al.* (1981), Abreu (1998) e Callado *et al.* (1999). Entretanto, qualitativamente, a amostra BrMg2-03 apresentou melhor replicação que a BrPe1-01, com formação de raros sincícios, porém alguns com mais de 20 núcleos, porém a amostra BrPe1-01 induziu o aparecimento de sincício com no máximo 10 núcleos. Por outro lado, as amostras CAEV Cork e Maedi-Visna K1514, utilizadas como padrões, replicaram bem com formação de sincícios grandes de aproximadamente 40 núcleos e degeneração celular, resultando na produção de títulos médios de $10^{-4,9}$ e $10^{-5,4}$ TCID₅₀, respectivamente (Figura 1).

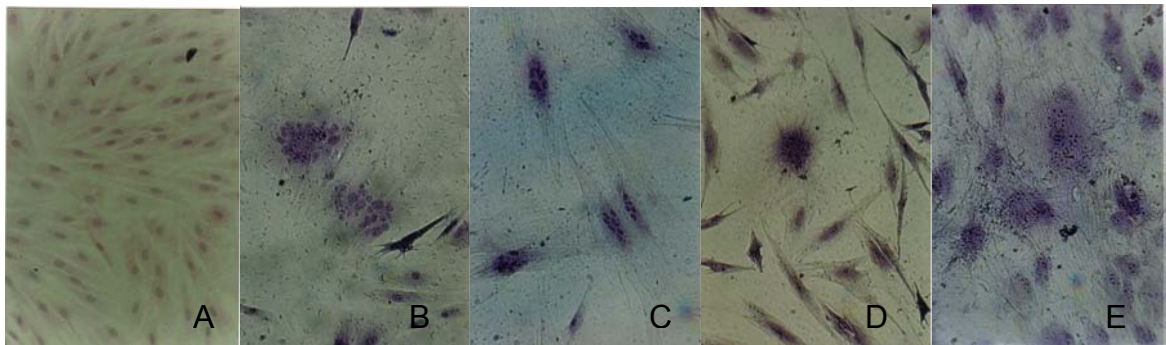


Figura 1: Efeito citopático de SRLV em células de membrana sinovial ovina coradas pelo corante de Giemsa (100x). A. Monocamada não infectada. B. Início da formação de sincício pela amostra BrPe1-01. C. Sincício causado pela amostra BrMg2-03. D. Sincício causado pela amostra CAEV Cork. E. Sincício causado pela amostra Maedi-Visna K1514.

A análise qualitativa do efeito citopático demonstrou que as amostras virais BrPe1-01 e BrMg2-03 replicaram melhor nas células heterólogas. Para confirmar esta observação, fez-se titulação da mesma alíquota da suspensão das amostras CAEV Cork e Maedi-Visna K1514 (colhida após terceira tripsinização) nas células de MS ovina e caprina. A amostra CAEV Cork produziu título de $10^{-4,5}$ e $10^{-5,3}$, em MSC e MSO e Maedi-Visna K1514 produziu título de $10^{-5,3}$ e $10^{-5,5}$, respectivamente (Figura 2).

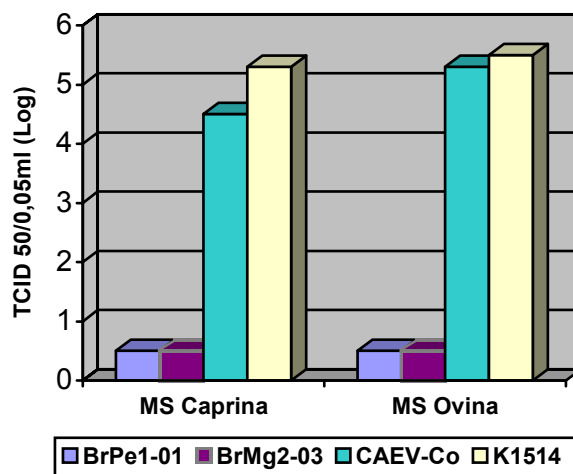


Figura 2: Título das amostras virais no sobrenadante obtido após passagens em células de membrana sinovial.

No que diz respeito à técnica de multiplicação viral, observou-se que todas as amostras apresentaram melhor resposta quando as monocamadas foram tripsinizadas. A tripsina é uma protease que catalisa a hidrólise de ligações peptídicas que envolvem a carboxila de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e seu uso em cultura celular para digerir a substância intercelular processo de tripsinização foi realizado com a finalidade de digerir a substância intercelular desprendendo as células, é possível que o processo de tripsinização tenha contribuído para melhor exposição dos receptores celulares para o vírus, aumentando a probabilidade de adsorção e replicação viral. Além disso, a intensa atividade de replicação celular após passagem, pode ter contribuído para este resultado.

A utilização da IDGA para pesquisa de antígenos virais nos sobrenadantes das culturas de BrPe1-01 e BrMg2-03 em células de MSO revelou a presença de linha de precipitação no sobrenadante concentrado da amostra CAEV Cork com soro padrão positivo (Institut Pourquier - Montpellier, França). Os sobrenadantes concentrados das amostras BrPe1-01 e BrMg2-03 não formaram linhas de precipitação com soro padrão (Figura 3). Estes resultados indicam que houve restrição da replicação com conseqüente baixa produção de antígenos e partículas virais, que não foram detectados pela IDGA, pois é um teste pouco

sensível e, como tal, incapaz de detectar pequenas quantidades de antígenos. Resultados similares haviam sido previamente obtidos por Callado *et al.* (1999).

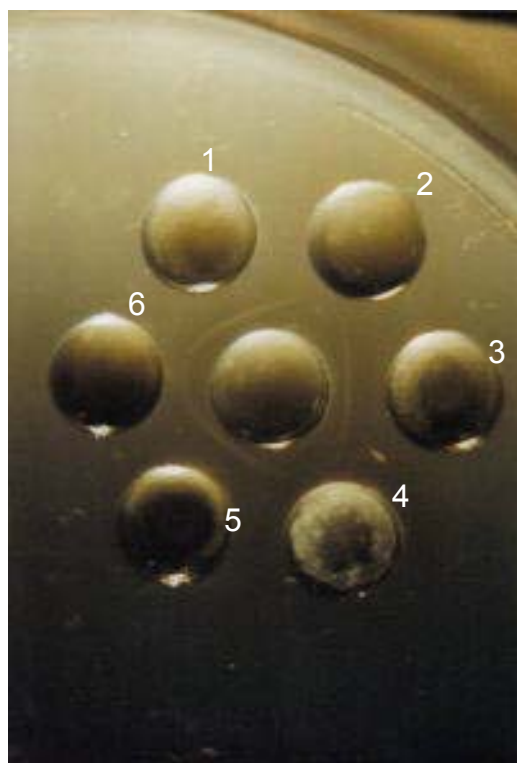


Figura 3: Teste de IDGA para detecção de antígenos no sobrenadante concentrado das culturas das amostras virais CAEV Cork, BrPe1-01 e BrMg2-03. Poço central: soro padrão positivo para Maedi-Visna. Poços 1, 3 e 5: antígeno padrão Maedi-Visna. Poço 2: antígeno BrPe1-01. Poço 4: antígeno BrMg2-03. Poços 6: antígeno CAEV Cork.

Antígenos virais nos sobrenadantes das culturas de BrPe1-01 e BrMg2-03 foram detectados pelo teste de ELISA (Figuras 4 e 5). As amostras BrMg2-03 e BrPe1-01 cultivadas em MSC, com discreto ECP, apresentaram títulos considerados como elevados.

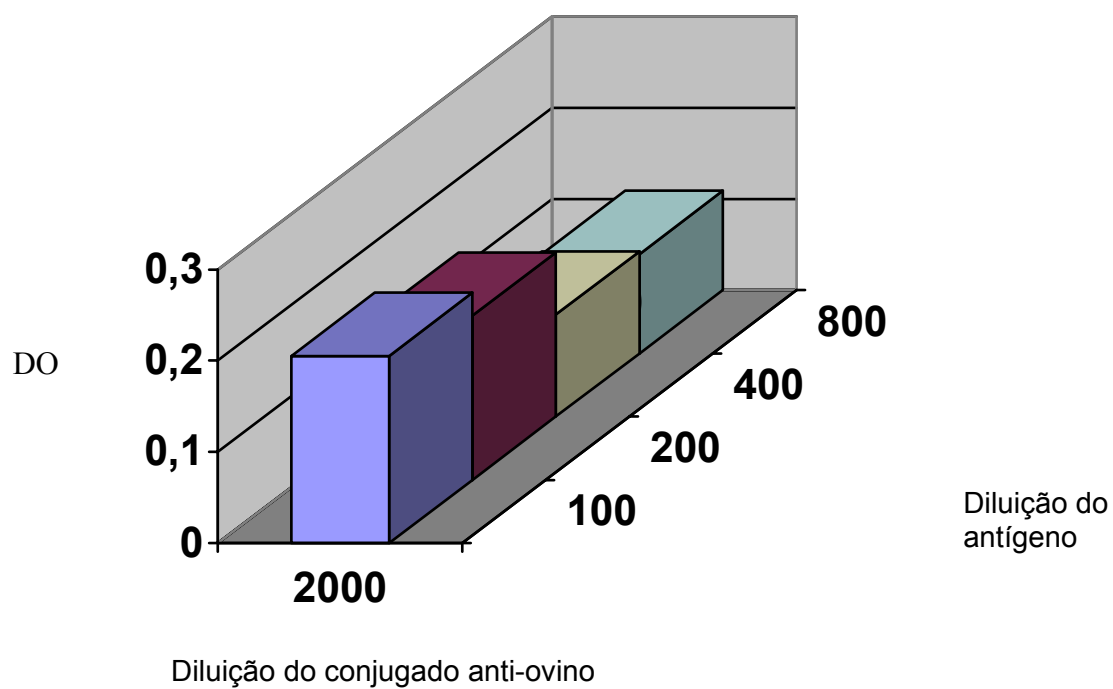


Figura 4 - Titulação em bloco do antígeno BrMg2-03 produzido em membrana sinovial caprina e do conjugado anti-ovino-peroxidase no teste de ELISA-i.

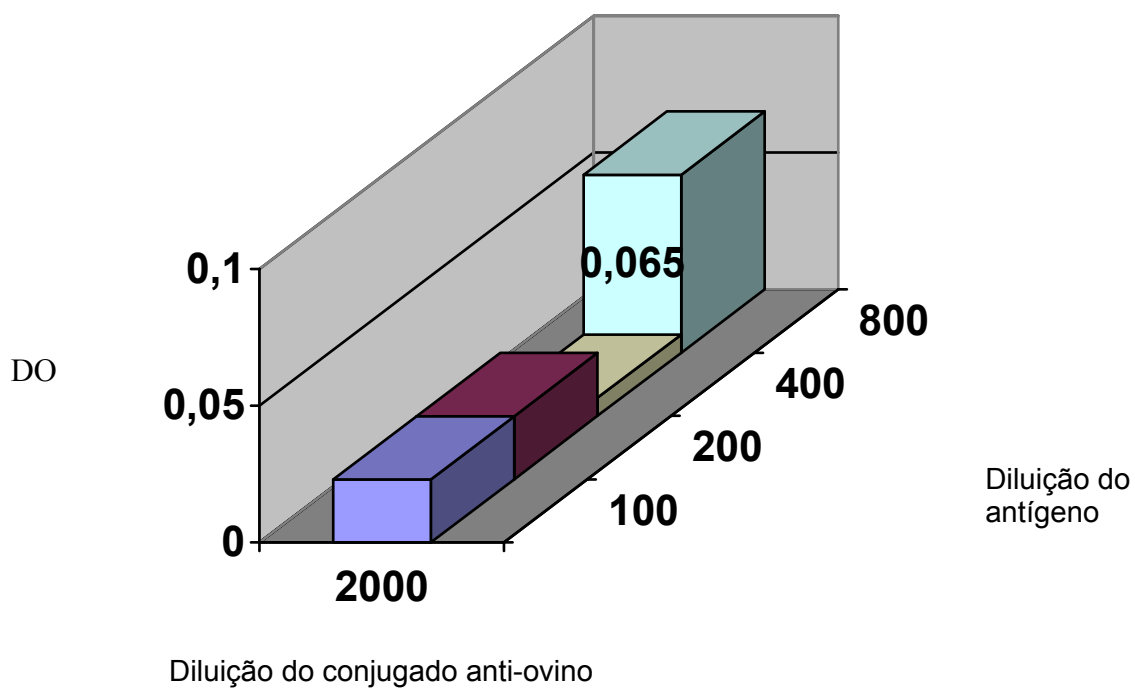


Figura 5 - Titulação em bloco do antígeno BrPe1-01 produzido em membrana sinovial caprina e do conjugado anti-ovino-peroxidase no teste de ELISA-i.

4. Discussão

Este estudo descreve, com base no efeito citopático, o comportamento das amostras brasileiras de SRLV BrPe1-01 e BrMg2-03 em culturas de células de MS obtidas de 9 caprinos e 3 ovinos, principal célula-alvo para replicação *in vitro* desses vírus (Crawford *et al.*, 1980), enquanto *in vivo*, as células do sistema fagocítico mononuclear constituem o principal alvo, com expressão viral e manifestação clínica da doença (Gendelman *et al.*, 1986). A replicação dos SRLV está associada com o efeito citopático característico que precede a morte celular. O efeito é caracterizado por sincício gerado através da fusão de células infectadas com células vizinhas susceptíveis, devido à interação das glicoproteínas do envelope viral com receptores celulares (Moore *et al.*, 1993). Apesar da progressão da apoptose celular estar correlacionada com o desenvolvimento de sincício, a formação de sincício não é um pré-requisito para a indução de apoptose pelo vírus (Gendelman *et al.*, 1997). Entretanto, em alguns sistemas CAEV Cork pode replicar na ausência de efeito citopático (Mselli-Lkhal *et al.*, 1999).

Os resultados obtidos sugerem que as amostras brasileiras BrPe1-01 e BrMg2-03 apresentam baixa infectividade para as culturas primárias de células de membrana sinovial *in vitro*, caracterizado pela redução na eficiência da replicação viral em culturas de células caprinas e ovinas. Amostras de SRLV apresentam variação na sua habilidade de replicar em culturas de células (Narayan *et al.*, 1980; Chebloune *et al.*, 1996; Callado *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999). A falta de infecção de células de membrana sinovial caprina pela suspensão viral de amostras ovinas de SRLV pode ser superada por macrófagos infectados, após contato célula-célula (Singh *et al.*, 1999). A inabilidade de algumas amostras em completar seu ciclo de replicação em culturas celulares não é exclusiva dos SRLV. Este fenômeno tem sido demonstrado em culturas infectadas com outros lentivírus como o HIV (Huang *et al.*, 1993; Schmidtmayerova *et al.*, 1992) e o SIV (Stephens *et al.*, 1995).

A forma clínica de apresentação da infecção por SRLV mais comum é a artrite. As células derivadas da membrana sinovial de caprinos e ovinos, um tipo celular fibro-epitelial, por sua permissividade tem sido utilizada como possível

modelo *in vitro* para o estudo da replicação restrita do vírus que ocorre *in vivo*. Chebloune *et al.* (1996), utilizando este sistema, observaram que o ciclo de replicação viral foi terminado antes da montagem da partícula viral, indicando que o genoma lentiviral permanece intacto nas culturas de células com infecção não produtiva, não citopática, pois o genoma viral pode ser recuperado por co-cultivo com células permissivas. A interrupção do ciclo de replicação ocorreu devido às falhas na proteólise da glicoproteína codificada pelo gene *env* e redução na síntese da proteína *gag*. Mecanismo similar pode ocorrer *in vivo* nas infecções não produtivas persistentes onde as células precursoras infectadas podem não apresentar enzimas necessárias para clivagem funcional das glicoproteínas virais. Estas enzimas podem se tornar funcionais apenas quando os precursores infectados se tornarem maduros e/ou ativados (Narayan *et al.*, 1983; Gendelman *et al.*, 1985 e 1986). Desta forma, o estrito tropismo *in vivo* provavelmente ocorre devido a um efetivo controle da replicação viral pós-penetração. Os fatores celulares para transcrição, os produtos dos genes *c-fos* e *c-jun* expressos durante ativação, são capazes de se fixar nos sítios AP-1 do LTR lentiviral e ativar a transcrição (Shih *et al.*, 1992). Os SRLV replicam em células terminalmente diferenciadas ou ativadas, entretanto, não dependem de divisão celular (Narayan and Clements, 1989).

Os melhores resultados obtidos em células de membrana sinovial ovina podem ser explicado considerando-se que, em condições experimentais, SRLV isolado de caprino pode infectar ovinos e vice-versa (Banks *et al.*, 1983; Oliver *et al.*, 1985; Dickson & Ellis, 1989); além disso, estudos filogenéticos de seqüenciamento de amostras de campo têm demonstrado amostra isolada em ovino mais próxima de CAEV Cork (Leroux *et al.*, 1995; Leroux *et al.*, 1997) e uma amostra caprina mais próxima de K1514 (Castro *et al.*, 1999a), sugerindo que variantes apresentam baixa ou nenhuma especificidade (Leroux *et al.*, 1997, Castro *et al.*, 1999a). Além disso, apesar dos lentivírus serem considerados hospedeiro-específicos, eles podem invadir novo hospedeiro de diferente espécie (Guiguen *et al.*, 2000; Morin *et al.*, 2003).

A eficiência da replicação do vírus pode ser influenciada por vários fatores inerentes ao próprio vírus, à célula ou ao sistema vírus-célula. Uma característica importante dos lentivírus é a capacidade de variação genética, que pode resultar no aparecimento de variantes com propriedades biológicas diferentes, as quais

podem ser patogênicas tanto *in vivo* quanto *in vitro*, influenciando na persistência, tropismo, replicabilidade, citopatogenicidade, resposta imunológica, curso clínico da doença (Quérat *et al.*, 1984; Cheevers *et al.*, 1988; Lairmore *et al.*, 1988; Blondin *et al.*, 1989) e mudanças no uso de receptor (Karlsson *et al.*, 2003). A falha do sistema imunológico na eliminação de todas as células infectadas, aliada à restrição da replicação (Narayan and Clements, 1989), também facilita a formação de variantes antigênicas, favorecendo o aparecimento de variantes mais evoluídas e adaptadas ao hospedeiro (Castro *et al.*, 1999a). Tem sido sugerido que o comportamento *in vitro*, lítico e não-lítico, não está relacionado ao uso de receptores diferentes, podendo ocorrer devido a uma melhor expressão na superfície e/ou incorporação no virion de glicoproteínas do envelope nas amostras líticas. Também pode estar relacionando com a eficiência com que diferentes envelopes se ligam a seus receptores ou iniciam a fusão na membrana celular.

A permissividade das células à infecção viral está condicionada à presença do receptor específico, responsável pela adsorção, e à disponibilidade de fatores celulares para transcrição. A identificação do receptor específico dos SRLV ainda é incerta (Jolly *et al.*, 1989; Crane *et al.*, 1991; Dalziel *et al.*, 1991; Hullinger *et al.*, 1993). Os receptores CD4 e CXCR4 não são os principais receptores para SRLV embora sua presença aumente a formação de sincício (Hovden & Sommerfelt, 2002). As amostras de SRLV CAEV Cork e maedi-visna K1514 diferem quanto ao tropismo *in vitro* (Lyall *et al.*, 2000). Receptores para a amostra maedi-visna K1514 estão presentes em linhagens de células do homem, macaco, rato, galinha, hamster (Lyall *et al.*, 2000) sugerindo que o tropismo por espécie restrito não é devido a uma distribuição limitada de receptores. Receptores funcionais para a amostra CAEV Cork não estão presentes em células humanas (Mselli-Lakhal *et al.*, 2000). Este reconhecimento de receptor diferente não está relacionado ao fenótipo lítico (Hötzel & Cheevers, 2001).

Culturas primárias de células apresentam células heterogêneas, com susceptibilidade diferente à infecção. Klevjer-Anderson e Cheevers (1981), demonstraram que a percentagem de células contendo RNA viral do CAEV, não era superior a 71-75%, mesmo utilizando-se 0,4 ou 4,0 TCID₅₀/célula. A redução na replicação viral observada neste trabalho em relação à replicação anteriormente observada das amostras brasileiras no mesmo sistema celular a

partir do qual foi isolado (Callado *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 1999c), pode ter sido resultado da variação genética das células do hospedeiro com eventual perda parcial dos receptores mais afins a estas amostras que às CAEV Cork e Maedi-Visna K1514, bem como de fator celular circunstancial produzido pelos explantes nos primeiros dias de cultivo. Futuros estudos do comportamento das amostras virais BrPe1-01 e BrMg2-03, utilizando em células de linhagem (Teixeira *et al.*, 1997) poderá minimizar a possibilidade de variação genética das células de membrana sinovial terem influenciado na replicação viral.

O fato de haver variação no comportamento de amostras de SRLV em cultivos de células homólogas ou heterólogas permite a elaboração de algumas hipóteses para explicar a dificuldade de diagnóstico da infecção por SRLV pelo isolamento ou sorologia. A restrição da expressão viral em cocultivos com células homólogas ou heterólogas pode levar a resultados falso-negativos, especialmente quando se pratica pesquisa de sincícios nas monocamadas como método de triagem ou quando se usa técnicas de detecção de antígenos ao invés de PCR. Por outro lado, tem-se observado que alguns animais sabidamente infectados soroconvertem tardiamente (Rimstad *et al.*, 1993). Se esses resultados forem aplicáveis às condições *in vivo*, a soroconversão tardia poderia ser resultado de diferentes padrões de restrição da expressão viral *in vivo*, decorrente da complexa interação vírus-hospedeiro. Neste caso, o uso de testes sorológicos como diagnóstico nos programas de controle, com a eliminação dos animais soropositivos pode favorecer a seleção de animais que respondem à infecção com baixos títulos, ou que soroconvertem tardiamente e/ou de amostras virais pouco indutoras de resposta humoral (Castro *et al.*, 1999b).

5. Referências bibliográficas

- Abreu, S. R. O., Castro, R. S., Nascimento, S. A., Souza, M. G., 1998. CAEV nucleoproteic antigen production and comparison with Maedi-Visna antigen in the immunodiffusion test. *Braz. J. Vet. Res.* 18(2) 57-60.
- Banks, K. L., Adams, D. S., McGuire, T. C., Carlson, J., 1983. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.* 44(12) 2307-2310.
- Barban, V., Quérat, G., Sauze, N., Filippi, P., Vigne, R., Russo, P.; Vitu, C., 1984. Lentiviruses are naturally resident in a latent form in long-term ovine fibroblast cultures. *J. Vir.* 52(2) 680-682.
- Blondin, I., Grillet, C., Thiogane, Y., 1989. Formation de syncytia en culture et analyse de la composition protéique de plusieurs souches de virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (CAEV). *Ann. Rech. Vét.* 20 153-158.
- Callado, A. K. C., Castro, R. S., Nascimento, S. A., Silva-Rodrigues, M. I. M., Pinto-Júnior, J. H., Teixeira, M. F. S., 1999. Preliminary characterization of the infection of synovial membrane cells by brazilian samples of small ruminants lentiviruses. *Vet. Sci. Trop.* 2(3) 152-159.
- Castro, R. S., Greenland, T., Leite, R. C., Gouveia, A., Mornex, J-F., Cordier, G., 1999a. Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. Gen. Virol.*, 80 1583-1589.
- Castro, R. S., Leite, R. C., Resende, M., Gouveia, A. M. G., 1999b. A labelled avidin-biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. *Vet. Res. Comm.*, 23 515-522.
- Castro, R. S., Leite, R. C., Resende, M., Martins, A., Gouveia, A. M. G., 1999c. Caprine arthritis encephalitis virus isolation and identification using fluorescent antibody and polymerase chain reaction. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51(3) 235-240.

- Chebloune , Y., Sheffer, D., Karr, B. M., Stephens, E., Narayan, O., 1996. Restrictive type of replication of ovine/caprine lentivirus in ovine fibroblast cell cultures. *Virol*, 222 21-30.
- Cheevers, W. P., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Cunningham, D. R., Adams, D. S., Gorham, J. R., 1988. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Lab. Inv.*, 58(5) 510-516.
- Cheevers, W. P., Roberson, S., Klevjer-Anderson, P., Crawford, T. B., 1981. Characterization of caprine arthritis-encephalitis virus: a retrovirus of goats. *Arch. Virol.*, 67 111-117.
- Coackley, W., Smith, V. W., Maker, D., Dickson, J., 1981. Isolation of caprine syncytial retroviruses. *Aust. Vet. J.*, 57 480-481.
- Cork, L. C., Hadlow, W. J., Crawford, T. B., Gorham, J. R., Piper, R. C., 1974. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.*, 129(2) 134-141.
- Crane, S. E., Kanda, P., Clements, J. E., 1991. Identification of the fusion domain in the visna virus transmembrane protein. *Virol.*, 185 488-492.
- Crawford, T. B., Adams, D. S., Cheevers, W. P., Cork, L. C., 1980. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 207 997-999.
- Dalziel, R. G., Hopkins, J., Watt, N. J., Dutia, B. M., Clarke, H. A. K., McConnell, I., 1991. Identification of a putative cellular receptor for the lentivirus visna virus. *J. Gen. Virol.* 72 1905-1911.
- Dickson, J., Ellis, T., 1989. Experimental caprine retrovirus infection in sheep. *Vet. Rec.*, 125 649.
- Eriksson, K., McInnes, E., Ryan, S., Tonks, P., McConnell, I., Blacklaws, B., 1999. CD4 T-cells are required for the establishment of maedi-visna virus infection in macrophages but not dendritic cells. *Virol.* 258 355-364.
- Gendelman, H. E., Narayan, O., Molineaux, S., Clements, J. E., Ghotbi, Z., 1985. Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophages precursors in bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82 7086-7090.
- Gendelman, R., Orzech, Y., Mashiah, P., Birenbaum, M., Gazit, A., Yaniv, A., 1997. Productive replication of caprine arthritis-encephalitis virus is associated with induction of apoptosis. *J. Gen. Virol.* 78 801-805.

- Gendelman, H. E., Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Ghotbi, Z., Clements, J. E., Stanley, J., Pezeshkpour, G., 1986. Tropism of sheep lentivirus for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.* 58(1) 67-74.
- Guiguen, F., Mselli-Laknal, L., Durand, J., Du, J., Favier, C., Fornazero, C., Grezel, D., Balleydier, S., Asuman, E., Chebloune, Y., 2000. Experimental infection of Mouflon-domestic sheep hybrids with caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.*, 61(4) 456-461.
- Hötzel, I., Bastos, E. S., Ravazzolo, A. P., Moojen, V., 1993. Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 26(11) 1175-1179.
- Hötzel, I., Cheevres, W., 2001. Host range of small-ruminant lentivirus cytopathic variants determined with selectable caprine arthritis-encephalitis virus pseudotype system. *J. Virol.*, 75(16) 7384-7391.
- Hovden, A.-O., Sommerfelt, M. A., 2002. The influence of CD4 and CXCR4 on maedi-visna virus induced syncytium formation. *APMIS*, 110 697-708.
- Huang, Z. B., Potash, M. J., Simm, M., Shahabuddin, M., Chao, W., Gendelman, H. E., Eden, E., Volsky, D. J., 1993. Infection of macrophages with lymphotropic human immunodeficiency virus type 1 can be arrested after viral DNA synthesis. *J. Virol.*, 67 6893-6896.
- Hullinger, G. A., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Cheevers, W. P., 1993. Caprine arthritis-encephalitis lentivirus SU is the ligand for infection of caprine synovial membrane cells. *Virol.*, 192 328-331.
- Jolly, P. E., Huso, P. L., Sheffer, D., Narayan, O., 1989. Modulation of lentivirus replication by antibodies: Fc portion of immunoglobulins molecule is essential for enhancement of binding, internalization and neutralization of visna virus in macrophages. *J. Virol.*, 63 1811-1813.
- Karlsson, I., Antonsson, L., Shi, Y., Karlsson, A., Albert, J., Leitner, T., Bjorn, O., Owman, C., Fenyö, E. M., 2003. HIV virological variability unveiled: frequent isolation and chimeric receptors reveal unprecedented variation of coreceptor use. *AIDS*, 17(18) 2561-2569.
- Klevjer-Anderson, P., Cheevers, W. P., 1981. Characterization of the infection of caprine synovial membrane cells by the retrovirus caprine arthritis-encephalitis virus. *Virol.*, 110 113-119.

- Lairmore, M. D., Poulson, J. M., Aducci, T. A., DeMartini, J. C., 1988. Lentivirus-induced lymphoproliferative disease: comparative pathogenicity of phenotypically distinct ovine lentivirus strains. *Am. J. Path.*, 130(1) 80-90.
- Leroux, C., Chastang, J., Greenland, T., Mornex, J. -F., 1997. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.*, 142 1125-1137.
- Leroux, C., Vuillermoz, S., Mornex, J.-F., Greenland, T., 1995. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentivirus obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. *J. Gen. Virol.*, 76 1533-1537.
- Lyall, J. W., Solanky, N., Tiley, L. S., 2000. Restricted species tropism of maedi-visna virus strain EV-1 is not due to limited receptor distribution. *J. Gen. Virol.*, 81 2919-2927.
- Milczewski, V., Sotomaior, C., Reischak, D., Von Groll, A., 1997. Relato do primeiro isolamento do vírus Maedi-Visna no Estado do Paraná. In: Congresso De Medicina Veterinária, 25, Gramado. Anais...Rio Grande do Sul. p. 179.
- Moojen, V., Barth, O. M., R. A., Von Groll, A., Cortes, L. M. C., Marchesin, D. M., 1995. Sheep maedi-visna virus: ultrastructural characterization of a Brazilian isolate. In: *Virológica*, 5, Ribeirão Preto. Anais...São Paulo. B14.
- Moore, J. P., Jameson, J. A., Weiss, R. A., Sattentau, Q. J., 1993. The HIV-cell fusion reaction. In *Viral Fusion Mechanisms*, 233-289. Edited by J. Bentz, Boca Raton, Fla.: CRC Press.
- Morin, T., Guiguen, F., Bouzar, B. A., Villet, S., Greenland, T., Grezel, D., Gounel, F., Gallay, K., Garnier, C., Durand, J., Alogninouwa, T., Mselli-Lakhal, L., Mornex, J.-F., Chebloune, Y., 2003. Clearance of a productive lentivirus infection in calves experimentally inoculated with caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.*, 77(11) 6430-6437.
- Mselli-Lakhal, L., Favier, C., Leung, K., Guiguen, F., Grezel, D., Miossec, P., Mornex, J., Narayan, O., Quérat, G., Chebloune, Y., 2000. Lack of functional receptors is the only barrier that prevents caprine arthritis-encephalitis virus from infecting human cells. *J. Virol.*, 74 8343-8348.

- Mselli-Lakhal, L., Guiguen, F., Fornazero, C., Du, J., Favier, C., Durand, J., Grezel, D., Balleydier, s., Mornex, J.-F., Chebloune, Y.. 1999. Goat milk Epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Viol.* 259 67-73.
- Narayan, O., Clements, J. E.. 1989. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.*, 70 1617-1639.
- Narayan, O., Clements, J. E., Janice, E., Strandberg, J. D., Cork, L. C., Griffin, D. E.. 1980. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis and goats. *J. Gen. Virol.*, 50 69-79.
- Narayan, O., Joag, S. V., Chebloune, Y., Zink, M. C., Clements, J. E.. 1997. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. *Viral Pathogenesis*, p. 657-668. Edited by N. Nathanson. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Narayan, O., Kennedy-Stoskopf, S., Sheffer, D., Griffin D. E., Clements, J. E.. 1983. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infect. Immun.*, 41 67-73.
- OIE/FAO. 1996. Animal Health Yearbook, v. 36 FAO.
- Oliver, R. E., Cathcart, A., McNiven, R., Poole, W., Robati, G., 1985. Infection of lambs with CAEV by feeding milk from infected goats. *Vet. Rec.*, 19 83.
- Quérat, G., Barban, V., Sauze, N., Filippi, P., Vigne, R., Russo, P., Vitu, C., 1984. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. *Viol.*, 52 672-679.
- Reed, L. J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27 493-497.
- Rimstad, E., East, N. E., Torten, M., Higgins, J., Derock, E., Pedersen, N. C., 1993. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection goats. *Am. J. Vet. Res.*, 54(11) 1858-1862.
- Ryan, S., Tiley, L., McConnell, I., Blacklaws, B., 2000. Infection of dendritic cells by maedi-visna lentivirus. *J. Virol.*, 74 100096-100103.
- Schmidtmayerova, H., Bolmont, C., Baghdiguian, S., Hirsch, I., Chermann, J. C., 1992. Distinctive pattern of infection and replication of HIV1 strains in blood-derived macrophages. *Viol.*, 190 124-133.
- Shih, D. S., Carruth, L. M., Anderson, M., Clements, J. E., 1992. Involvement of fos and jun in the activation of visna virus gene expression in macrophages through an AP-1 site in the viral LTR. *Viol.*, 190 84-91.

- Sigurdsson, B., Thormar, H., Pálsson, P. A., 1960. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch. Virusforsch*, 10 368-381.
- Singh, D. K., Chebloune, Y., Mselli-Lakhal, L., Karr, B. M., Narayan, O., 1999. Ovine lentivirus-infected macrophages mediate productive infection in cell types that are not susceptible to infection with cell-free virus. 80 1437-1444.
- Stephens, E. B., McClure, H. M., Narayan, O., 1995. The proteins of lymphocyte and macrophage tropic strains of simian immunodeficiency virus are processed differently in macrophages. *Virology*, 206 535-544.
- Teixeira, M. F. S., Veronique, L., Mselli-Lakhal, L., Chettab, A., Chebloune, Y., Mornex, J. F., 1997. immortalization of caprine fibroblasts permissive for replication of small ruminant lentiviruses. *Am. J. Vet. Res.*, 58 (6) 579-584.

CAPÍTULO 3

“LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM CAPRINOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO”

Trabalho a ser submetido a periódico

Journal Veterinary Medicine B

Fator de impacto: 0,676

LEVANTAMENTO SOROEPIDEMIOLÓGICO DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES EM CAPRINOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO.

CALLADO, A.K.C.,¹ CASTRO, R.S.,³ FALCÃO, L.S.P.C.A.,³ OLIVEIRA, E.J.C.,⁴ FALCÃO, M.C.A.,⁴ NASCIMENTO, S.A.,³ CAMPOS, K.M.T.,³ TINÉ, E.,³ LIMA, V.L.M.²

¹ Laboratório de Apoio Animal do MARA – LAPA/RECIFE.. Recife, PE.

² Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica. Recife-PE.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina Veterinária. Recife-PE.

⁴ Médico Veterinário.

RESUMO – Foi feito um levantamento sorológico nos anos de 2002 e 2003, para identificação de animais infectados por lentivírus de pequenos ruminantes (SRLV) do Estado de Pernambuco com o objetivo de estudar aspectos epidemiológicos da infecção por SRLV. Foram testados em 2206 animais distribuídos em 31 rebanhos caprinos de exploração leiteira e/ou seleção genética leiteira e caprinos de corte e/ou seleção genética para corte, pertencentes a 30 propriedades rurais. Todos os animais dos rebanhos foram testados. Os criatórios estavam distribuídos nas regiões da Zona da Mata, Agreste e Sertão do Estado de Pernambuco. A detecção de anticorpos precipitantes foi feita através do teste de imunodifusão em gel de Agar utilizando antígeno CAEV Cork. Dos animais testados, 15,3% (338/2206) foram considerados positivos. Dos rebanhos testados, 74,2% (23/31), apresentaram pelo menos um animal positivo. Estes dados indicam que as SRLV representam problema sanitário para o rebanho de Pernambuco necessitando que medidas de controle efetivas sejam adotadas.

INTRODUÇÃO

As lentivirose de pequenos ruminantes (SRLV) são doenças degenerativas progressivas crônicas que acometem caprinos e ovinos de todas as raças e idades (Narayan *et al.*, 1997). As SRLV podem se manifestar na forma artrítica, respiratória, mamária e nervosa ou mesmo atingir vários órgãos devido a replicação viral em células da linhagem monocítico-fagocitária que são as principais células-alvo.

Os SRLV têm sido identificados em diversos países com prevalências mais elevadas naqueles em que a ovino e caprinocultura são mais tecnificadas, causando significativas perdas econômicas decorrentes da diminuição da vida produtiva e da produção leiteira, retardo no crescimento das crias, desvalorização comercial dos produtos com animais infectados e despesas com programas de controle (Péretz *et al.* 1993, Greenwood 1995, de la Concha-Bermejillo 1997, Arsenault *et al.* 2003a). No Brasil, tem sido registrada a ocorrência de animais infectados em vários Estados (Garcia *et al.*, 1992, Hötzel *et al.*, 1993, Saraiva Neto *et al.* 1995, Marchesin *et al.*, 1998, Castro *et al.* 1999abc)

A principal forma de transmissão é através da ingestão de colostro e/ou leite proveniente de animais infectados (Narayan *et al.* 1997, Callado *et al.* 1999). Fatores como estresse, tipo de nutrição e condições gerais de higiene podem afetar a prevalência de animais soropositivos e clinicamente afetados, após a introdução do vírus em um rebanho (Crawford and Adams, 1981, Péretz *et al.* 1993, Straub, 2004). Ainda não existe vacina contra o vírus (Kemp *et al.* 2000, Cheevers *et al.* 2000, Cheevers *et al.* 2001). A identificação dos animais infectados associada ao descarte e/ou separação são os principais meios implementados para prevenir a disseminação da doença (Sihvonen *et al.*, 2000). O diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos para SRLV geralmente por imunodifusão e gel de Agar (IDGA) e *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Zanoni *et al.*, 1994, Celer Jr. *et al.*, 1998, Castro *et al.* 1999b, Sihvonen *et al.*, 2000, Hermann *et al.* 2003).

METODOLOGIA

O Estado de Pernambuco situa-se na Região Nordeste e possui uma extensão territorial de 98.281 Km², dividido em três regiões: Zona da Mata, Agreste e Sertão. O Estado é formado por 185 municípios. O efetivo caprino é de 1.405.479 cabeças (IBGE 2000). A amostragem foi por conveniência e o critério de adesão da propriedade ao estudo foi a cooperação do criador, sendo testado todos os animais da propriedade, perfazendo um total de 2206 caprinos, em 31 rebanhos caprinos pertencentes a 30 propriedades rurais distribuídos em 17 municípios, das 3 regiões do Estado de Pernambuco.

Foi feito um levantamento sorológico para identificação de animais infectados nos anos de 2002 e 2003, considerando como universo amostral as propriedades relacionadas pela Associação Pernambucana dos Criadores de Caprinos e Ovinos e por técnicos do setor. Tal universo amostral foi subdividido em dois grupos, o primeiro grupo composto por rebanhos com animais de aptidão leiteira e, o segundo grupo composto por rebanhos com animais de aptidão para corte; puros ou mestiços, de ambos os sexos e de diversas idades. Incluindo-se em cada grupo os rebanhos destinados ao melhoramento genético de acordo com a aptidão produtiva de cada raça. Quanto à classificação dos animais pela idade utilizou-se a verificação da arcada dentária, em especial, dos dentes incisivos, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Idade aproximada baseada na modificação da primeira para a segunda dentição dos dentes incisivos.

Dentição – Dentes incisivos (Modificação da primeira para a segunda dentição)	Idade aproximada (meses)
1ª muda dos dentes incisivos (Pinças)	12 a 18
2ª muda dos dentes incisivos (Primeiros Médios)	18 a 22
3ª muda dos dentes incisivos (Segundos Médios)	24 a 30
4ª muda dos dentes incisivos (Cantos)	34 a 38

Ribeiro, 1997.

A detecção de anticorpos precipitantes foi feita através do teste de imunodifusão em gel de agar como descrito por Abreu *et al.* (1998). Para a produção de antígeno, as monocamadas de membrana sinovial subconfluentes de baixa passagem foram inoculadas com a amostra CAEV Cork (Cork *et al.*, 1974). As colheitas dos sobrenadantes foram feitas a cada 7 dias após o aparecimento do efeito citopático característico de sincício. O sobrenadante colhido foi armazenado a -20 °C. Após o descongelamento, o pool de sobrenadante das monocamadas infectadas foi centrifugado a 3.300 x g durante 20 min. O sobrenadante foi então removido e dialisado em membrana de diálise de 33 X 21 mm (INLAB-Ind. Bras.) contra PEG 8.000 (10%) em PBS, a 4 °C, durante 48 a 72 h, até concentrá-lo cerca de 100 vezes, quando foi colhido e estocado a 4 °C. O padrão positivo foi obtido coletando-se sangue de caprino forte positivo para CAEV testado através do IDGA, com o kit comercial IDG-CAEV P28 Lote 074 (Institut Pourquier, Montpellier, França).

O teste de IDGA foi feito usando placas de Petri de plástico, com 90 mm de diâmetro contendo 16 mL de 1,1% de Agar noble (Difco, USA) em tampão borato (0,05 mol/L NaOH and 0,016 mol/L H₃BO₃). Após a solidificação, as placas foram mantidas a 4 °C. O gel foi perfurado com um molde em forma de roseta, de maneira a formar sete poços de 8 mm de diâmetro e 3 mm de distância entre as bordas, sendo um central e seis periféricos. A leitura foi realizada com 72 horas. Considerou-se como reação positiva àquelas que formaram uma linha de precipitação entre o poço do antígeno e o do soro teste e negativos a ausência dessa linha.

Os cálculos da prevalência e das frequências nos estratos foram feitos baseados nos resultados do teste de IDGA. A comparação das frequências entre os estratos foi feita através do teste do qui-quadrado com o auxílio do aplicativo estatístico SPSS versão 10.0 para Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram colhidas 2206 amostras de soros de caprinos de 30 propriedades rurais localizadas em 17 municípios, pertencentes a 3 regiões do Estado de Pernambuco (Figura 1). Através do teste de IDGA detectou-se uma prevalência de 15,3% de animais soropositivos.



Figura 1: Localização dos 31 rebanhos caprinos nas 3 regiões do Estado de Pernambuco.

A distribuição dos criatórios, segundo o número de animais soropositivos, demonstrou que 74,2% dos rebanhos apresentaram pelo menos um animal positivo e 6,4% apresentaram uma prevalência maior que 50%. (Tabela 2).

Tabela 2: Número de caprinos positivos para SRLV através do teste de IDGA por rebanho.

Rebanhos (R) testados	Número de animais	Número de positivos	% de animais positivos
R 1	18	4	22,2
R 2	100	0	0
R 3	136	67	49,3
R 4	47	0	0
R 5	55	0	0
R 6	17	1	5,9
R 7	61	10	16,4
R 8	9	0	0
R 9	43	14	32,6
R 10	12	1	8,3
R 11	32	0	0
R 12	35	8	22,9
R 13	10	0	0
R 14	6	1	16,7
R 15	25	12	48,0
R 16	25	2	8
R 17	31	2	6,5
R 18	31	2	6,5
R 19	239	2	0,8
R 20	85	45	52,9
R 21	138	59	42,8
R 22	59	6	10,6
R 23	72	4	5,6
R 24	142	80	56,3
R 25	424	2	0,5
R 26	18	2	11,1
R 27	84	1	1,2
R 28	103	11	10,7
R 29	120	0	0
R 30	12	2	16,7
R 31	17	0	0
Total	2206	338	15,3

As propriedades que não apresentaram animais soropositivos podem realmente ser livre do vírus ou ainda existem animais latentemente infectados que ainda não soroconverteram (Sihvonen, 1981) ou apresentam baixos títulos

de anticorpos, não detectados pelo teste de IDGA (Castro *et al.*, 1999b). Os aspectos da interação lentivírus-hospedeiro que afetam a detecção de caprinos infectados incluem a persistência, a heterogeneidade e as mutações virais em animais infectados, e baixos níveis de replicação *in vivo* (Haase, 1986, Narayan & Clements, 1989, Narayan *et al.*, 1993). Existe um elevado grau de homologia na sequência nucleotídica entre os SRLV, especialmente no gene *gag* (Leroux *et al.*, 1997), que refletem na resposta sorológica dos animais infectados (Gogolewski *et al.*, 1985, Leroux *et al.*, 1997), permitindo a utilização de antígeno do vírus ovino para detectar anticorpos contra SRLV em caprinos. Foi utilizado antígeno CAEV Cork pois estudos têm revelado que quando se utilizam antígenos do vírus caprino nos testes sorológicos de caprinos obtém-se melhores resultados (Knowles *et al.*, 1994, Abreu *et al.*, 1998).

Analisando-se os resultados de acordo com o tipo de exploração do rebanho (leite ou corte) obteve-se uma prevalência de 26,0 % de animais positivos nos rebanhos leiteiros e 2,0 % de animais positivos nos rebanhos destinados a exploração de animais com aptidão para corte (Tabela 3). Em estudos anteriores em rebanhos de caprinos leiteiros do Estado de Pernambuco foi encontrada uma prevalência de 17,6% animais soropositivos para SRLV (Saraiva Neto *et al.*, 1995).

Tabela 3: Número de caprinos positivos para SRLV através do teste de IDGA por exploração.

	Negativo	Positivo	Total	% de positivo
Rebanho leiteiro	904	318	1222	26,0 ^a
Rebanho de corte	964	20	984	2,0 ^b
Total	1868	338	2206	

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (X^2 ; $P < 0,01$) entre os estratos.

Quando analisamos os resultados nos estratos com base no sexo, encontramos uma prevalência de 15,4% e 14,2%, respectivamente para fêmeas e machos. Não observamos diferença significativa entre os sexos (Tabela 4) (X^2 ; $P < 0,01$), indicando que não existe uma predileção por sexo, apesar de alguns relatos indicam maior prevalência em animais do sexo masculino (Cutlip *et al.*, 1988, Rowe & East, 1997). Uma prática comum adotada entre os criadores é o uso de pool de colostro e leite para amamentar cabritos, o que facilita a disseminação da infecção em ambos os sexos. (Guiguen *et al.*, 1990, Péretz *et al.*, 1983). Outra forma de disseminação pode ser o aproveitamento de resto de soro do leite para complementação da alimentação das crias, pois, já foi detectado DNA proviral em células do lactosoro (Russo *et al.*, 1997).

Dos 27 machos positivos, 14 são reprodutores. Estes animais podem estar disseminando o vírus no próprio criatório ou para outros rebanhos, pois outra prática comum entre os criadores é o empréstimo de reprodutores ou a utilização de reprodutores em condomínio durante o período de monta. A transmissão venérea é possível uma vez que foi detectado RNA viral no sêmen de: carneiros naturalmente infectados (Chastang *et al.*, comunicação pessoal); carneiros experimentalmente infectados por SRLV e *Brucella ovis* (de la Concha- Bermejillo *et al.*, 1996); caprinos experimentalmente infectados (Travassos *et al.*, 1998), de caprinos naturalmente infectados, e de carneiros (Travassos *et al.*, 1999).

Vários estudos indicam a possibilidade de infecção intra-uterina e de transmissão vertical (Cutlip *et al.*, 1981, Ali, 1987, Brodie *et al.*, 1994). Adams *et al.* (1983) descreveram soroconversão de cabritos nascidos por cesariana que não receberam colostro. Alguns achados corroboram com a possibilidade de transmissão vertical é que *in vitro* CAEV replica eficientemente em células da granulosa caprina (Lamara *et al.*, 2001). A detecção da presença do DNA proviral no trato genital de cabras (Fieni *et al.*, 2003) e em embriões (Lamara *et al.*, 2002) sugerem que pode haver transmissão vertical.

Tabela 4: Número de caprinos positivos para SRLV através do teste de IDGA por sexo.

Sexo	Positivo	Negativo	Total
Fêmea	311	1705	2016
Macho	27	163	190
Total	338	1868	2206

Não houve diferença significativa (X^2 ; $P < 0,01$) entre os estratos.

Não houve diferença significativa entre a prevalência da infecção nas diversas faixas etárias (Tabela 5). Em rebanhos com alta taxa de infecção a soroprevalência pode ser elevada entre os animais jovens (East *et al.*, 1987). Entretanto, avaliando-se a situação de cada rebanho, naqueles em com prevalência abaixo de 10%, foi observada maior prevalência de animais soropositivos entre os animais de idade elevada, seguida dos animais com menos de um ano de idade (dados não mostrados). Este resultado corrobora com o fato de que um fator importante é o tempo de exposição para a soroconversão deste modo, observa-se uma maior frequência de soropositivos em animais mais velhos (Houwers & van der Molen, 1987, Rowe *et al.*, 1991, Saraiva Neto *et al.*, 1995, Arsenault *et al.* 2003a). Nos rebanhos com prevalência elevada, a infecção esta disseminada entre os animais de todas as faixas etárias.

Quanto ao aspecto clínico, poucos animais positivos apresentavam sintomatologia clínica compatível com o resultado da sorologia. De 338 animais positivos apenas 5 caprinos (0,2%) apresentavam quadro clínico com sintomas evidentes de CAEV. Do universo de animais clinicamente afetados 3 apresentavam doença na forma artrítica e 2 na forma respiratória.

O rebanho do Estado de Pernambuco é composto por diversos grupamentos raciais e, principalmente, por seus mestiços. As raças predominantes no levantamento foram: Alpina, Alpina Americana, Anglo-nubiana, Boer, Murciana, Saanen e Toggenburg, bem como por diversos graus de mestiçagem das raças citadas anteriormente. Os resultados dos estratos baseado na raça revelaram que houve diferença significativa (Tabela 6) (X^2 ;

$P<0,05$). Existindo uma prevalência SRLV significativamente mais elevada nos rebanhos compostos por caprinos de raças leiteiras e seus mestiços de diversos graus de sangue, em contraste, os animais de raças de corte e mestiços de corte apresentaram uma prevalência significativamente mais baixa. Tal fato demonstra que o SRLV está mais difundido nos animais descendentes das raças européias. Nas raças de corte a incidência da infecção pode originar-se no convívio destas com animais das raças leiteiras, seja pelo uso do aleitamento das crias de corte com leite fornecido por cabras leiteiras, ou ainda, quando do uso da biotecnologia da transferência de embriões utilizando-se fêmeas de origem leiteira infectadas por SRLV como receptoras de embriões. Além disso, existe o livre comércio de animais sem conhecimento do status sanitário.

Tabela 5: Percentual de caprinos positivos para SRLV através do teste de IDGA por idade, baseado na dentição.

Dentição	Total	% positivos
Dente de leite	472	21,4
1 ^a muda	327	14,8
2 ^a muda	379	17,2
3 ^a muda	549	24,9
4 ^a muda	479	21,7
Total	2206	

Não houve diferença significativa entre os estratos (X^2 ; $P<0,05$).

As lentivirose de pequenos ruminantes não são doenças de notificação obrigatória, o que dificulta o controle. A completa erradicação da infecção só será possível através da adoção de programas de controle, de adesão voluntária, baseados no teste periódico de todos os animais da propriedade, eliminação ou separação dos animais soropositivos, restrição à entrada de animais na propriedade e usar material estéril para evitar a transmissão através de células sanguíneas infectadas (Brodie *et al*, 1998). Cuidados adicionais incluem os cuidados na produção de embriões in vitro, minimizando a transmissão precoce

de SRLV aos embriões (Lamara *et al.*, 2001). Estudos filogenéticos de amostras de lentivírus de caprinos e ovinos sugerem a transmissão entre espécies (Castro *et al.* 1999a). Por este motivo, deve-se incluir os ovinos nos programas de controle. Como ocorre a disseminação viral através do comércio internacional de animais (Shah *et al.* 2004), restringir ao máximo a entrada de animais com sorologia desconhecida na propriedade.

Tabela 6: Percentual de caprinos positivos para SRLV através do teste de IDGA por raça.

Raça	Total	% positivos
Toggenburg	115	51,3 ^a
Murciana	92	44,6 ^a
Alpina	119	24,4 ^b
Anglo-nubiana	354	23,4 ^b
Mestiças de leite	219	19,6 ^{b,c}
Saanen	376	18,6 ^c
Alpina Americana	134	7,5 ^d
Boer	150	1,3 ^e
Mestiças de corte	635	0,2 ^e
Outras raças de corte	12	0 ^e
Total	2206	

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (χ^2 ; $P < 0,05$) entre os estratos.

REFERÊNCIAS

- Abreu S. R. O., R.S. Castro., S.A. Nascimento,. and M. G Souza, 1998: CAEV nucleoproteic antigen production and comparison with Maedi-Visna antigen in the immunodiffusion test. *Braz. J. Vet. Res.* 18(2):57-60.
- Adams, D. S., P. Klevjer-Anderson, B. S. Carlson, and T. C. Mcguire, 1983: Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1670-1675.
- Ali, O. A., 1987: Caprine arthritis-encephalitis related changes in the uterus of a goat. *Vet. Rec.* 121: 131-132.
- Arsenault J., P. Dubreuil, C. Girard, C. Simard, and D. Belanger, 2003a: Maedi-visna impact on productivity in Quebec sheep flocks (Canada). *Prev. Vet. Med.* 59(3):125-137,
- Brodie, S. J., A. de la Concha-Bermejillo, G. Koenig, G. D. Snowder, and J. C. Demartini, 1994: Maternal factors associated with prenatal transmisión of ovine lentivirus. *J. Infect. Dis.* 169: 653-657.
- Brodie, S. J., A. de la Concha-Bermejillo, G. D. Snowder, and J. C. DeMartini, 1998: Current concepts in the epizootiology, diagnosis, and economic importance of ovine progressive pneumonia in North America: a review. *Small Rum. Res.* 27:1-17.
- Callado A. K. C., R. S. Castro, S. A. Nascimento, M. I. M. Silva-Rodrigues, J. H. Pinto-Júnior, and M. F. S. Teixeira, 1999: Preliminary characterization of the infection of synovial membrane cells by Brazilian samples of small ruminants lentiviruses. *Vet. Sci. Trop.* 2(3): 152-159.
- Castro R. S., T. Greenland, R. C. Leite, A. Gouveia, J-F. Mornex, and G. Cordier, 1999a: Conserved sequence motifs involving the *tat* reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *J. Gen. Virol.* 80:1583-1589.
- Castro R. S., R. C. Leite, M. Resende, and A. M. G. Gouveia, 1999b: A labelled avidin-biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. *Vet. Res. Comm.* 23: 515-522.
- Castro, R. S., R. C. Leite, M. Resende, A. Martins, and A. M. G. Gouveia, 1999c: Caprine arthritis encephalitis virus isolation and identification using fluorescent

- antibody and polymerase chain reaction. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51: (3): 235-240.
- Celer Jr., V., V. Celer, H. Némcová, R. G. Zanoni, and E. Peterhans, 1998: Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *J. Vet. Med. B*, v. 45, p. 183-188.
- Chastang, J. Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Pulmonaire, Service de Pneumologie, Hôpital Louis Pradel/Laboratoire Associé de Recherche sur les Lentivirus chez les Petits Ruminants, INRA-Ecole Vétérinaire de Lyon, France. (comunicação pessoal)
- Cheevers, W. P., J. C. Beyer, and I. Hötzel, 2001: Plasmid DNA encoding caprine interferon gamma inhibits antibody response to caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) surface protein encoded by a co-administered plasmid expressing CAEV *env* and *tat* genes. *Vaccine* 19: 3209-3215.
- Cheevers, W. P., I. Hötzel, J. C. Beyer, and N. Kumpula-McWhirter, 2000: Immune response to caprine arthritis-encephalitis virus surface protein induced by coimmunization with recombinant vaccinia viruses expressing the caprine arthritis-encephalitis virus envelope gene and caprine interleukin-12. *Vaccine* 18, 2494-2503.
- Cork, L. C., W. J. Hadlow, T. B. Crawford, J. R. Gorham, and R. C. Piper, 1974: Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *J. Infect. Dis.* 129(2): 134-141.
- Crawford, T. B., and D. S. Adams, 1981: Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. *JAVMA* 178(7): 713-719.
- Cutlip, R. C., T. A. Jackson, and A. L. Gwen, 1977: Immunodiffusion test for Ovine Progressive Pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 38(7): 1081-1084.
- Cutlip, R. C., H. D., Lehmkuhl, and T. A. Jackson, 1981: Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1795-1797.
- Cutlip, R. C., H. D. Lehmkuhl, M. J. F. Schmerr, and K. A. Brogden, 1988: Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet. Microbiol.* 17: 237-250.
- de la Concha-Bermejillo, A., 1997: Maedi-visna and ovine progressive pneumonia. *Vet. Clin. North. Am.: Food Animal Pract.* 13: 12-33.

- de la Concha-Bermejillo, A., S. Magnus-Corral, S. J. Brodie, and J.C. DeMartini, 1996: Veneral shedding of ovine lentivirus in infected rams. *Am. J. Vet. Res.* 57: 684-688.
- East, N. E., J. D. Rowe, B. R. Madewell, and K. Floyd, 1987. Serologic prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190:182-186.
- Fieni F., J. Rowe, K. Van Hoosear, C. Burucoa, S. Oppenheim, G. Anderson, J. Murray, and R. BonDurant, 2003: Presence of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) proviral DNA in genital tract tissues of superovulated dairy goat does. *Theriogenology* 59(7): 1515-1523.
- Garcia, M., M. Galhardo, W. P. Araujo, J.L. D'angelino, P.S. Bastos, and A.J. Rossini, 1992. Caprine arthritis-encephalitis (CAE). Occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. *Trop. An. Health Prod.* 24:164.
- Gogolewski, R. P., D. S. Adams, T. C. McGuire, K. L. Banks, and W. P. Cheevers, 1985: Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 66: 1233-1240.
- Greenwood, P. L, 1995: Effects of caprine arthritis-encephalitis virus on productivity and health of dairy goats in New South Wales, Australia. *Prev. Vet. Med.* 22: 71-87.
- Guiguen, F., C. Lerondelle, and C. Favier, 1990: Réponse du chevreau à des monocytes infectés in vitro par le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre. *Ann. Rech. Vét.* 21: 179-185.
- Haase, A. T., 1986: Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 322: 130-136.
- Houwers, D. J. and E. J. van Der Molen, 1987: A five-year serological study of natural transmission of maedi-visna virus in a flock of sheep, completed with post mortem investigation. *J. Vet. Med. B* 34: 421-431.
- Hermann, L. M., W. P. Cheevers, T. C. McGuire, D.S. Adams, M. M. Hutton, W. G. Gavin, and D. P. Knowles, 2003: Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: diagnostic tool for successful eradication. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10(2): 267-271.

- Hötzel, I., E. S. Bastos, A. P. Ravazzolo, and V. Moojen, 1993: Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26(11): 1175-1179.
- Kemp, R. K., D. P. Knowles, L.L. Perry, T. C. McGuire, T. E. Besser, and W. P. Cheevers, 2000: Crossreactive neutralizing antibodies induced by immunization with caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Vaccine* 18:1282-1287.
- Knowles, D. P., J. F. Evermann, C. Shropshire, J. Vanderschalie, D. Bradway, H. M. Gezon, and W. P. Cheevers, 1994: Evaluation of agar gel immunodiffusion serology using caprine and ovine lentiviral antigens for detection of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Clin. Microbiol.* 32: 243-245.
- Lamara, A., F. Fieni, L. Mselli-Lakhal, G. Chatagnon, J. F. Bruyas, D. Tainturier, I. Battut, C. Fornazero, and Y. Chebloune, 2002: Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology* 58(6): 1153-1163.
- Lamara, A., F. Fieni, L. Mselli-Lakhal, D. Tainturier, and Y. Chebloune, 2001: Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Res.* 79: 165-172.
- Leroux, C., J. Chastang, T. Greeland, and J.-F., 1997: Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Arch. Virol.* 142:1125-1137.
- Marchesin, D. M., V. Mojen, and A. P. Ravazzolo, 1998: Molecular characterization of part of the *gag* gene of caprine arthritis-encephalitis virus isolated from naturally infected goats from Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz. J. Vet. Res.* 18(3/4): 119-126.
- Narayan, O., and J. E. Clements, 1989: Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J. Gen. Virol.* 70: 1617-1639.
- Narayan O., M. C. Zink, M. Gorrell, S. Crane, D. Huso, P. Jolly, M. Saltarelli, R. P. Adams and J. E. Clements, 1993: The lentivirus of sheep and goats. *The Retroviridae*, pp. 229-255. Edited by J. A. Levy. New York and London.
- Narayan O., S. V. Joag, Y. Chebloune, M. C. Zink, and J. E. Clements, 1997: Visna-maedi: the prototype lentiviral disease.

- Viral pathogenesis, p. 657-668. Edited by N. Nathanson. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Péretz G., J. Asso, and P. Devillechaise, 1993: Le caev: revue des conséquences pratiques. *Revue Méd. Vét.* 144(2): 93-98.
- Ribeiro, S. D. A., 1997: *Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos*. Nobel, São Paulo.
- Rowe, J. D., and N. E. East, 1997: Risk factors for transmission and methods for control of caprine Arthritis-Encephalitis virus infection. *Vet. Clin. North A.: Food An. Pract.*, 13: 34-53.
- Rowe, J. D., N. E. East, M. C. Thurmond, and C. E. Frantil, 1991: Risk factors associated with caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats on California dairies. *Am. J. Vet. Res.* 52: 510-514.
- Russo, P., C. Vitu, A. Bourgogne, M. Vignoni, G. Abadie, V. David, and M. Pépin, 1997: Caprine Arthritis-Encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *Vet. Rec.* 140: 483-484.
- Saraiva Neto A.O., R. S. Castro, E. H. Birgel, and S. A. Nascimento, 1995: Sero-epidemiological survey on caprine arthritis-encephalitis in Pernambuco, Brazil.. *Braz. J. Vet. Res.* 15:121-124.
- Shah C., J. Boni, J. B. Heeder, H. R. Vogt, J. Mühlherr, R. Zanoni, R. Miserez, and J. Schüpbach, 2004: Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology* 15p. In press.
- Sihvonen, L., 1981: Early immune responses in experimental maedi. *Res. Vet. Sci.* 30: 217-222.
- Sihvonen, L., L. Nuotio, U. Rikula, V. Hirvelä-Koski, and U-M. Kokkonen, 2000: Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev. Vet. Med.* 47: 213-220.
- Straub O.C., 2004: Maedi-visna virus infection in sheep: history and present knowledge. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27 (1): 1-5.
- Travassos, C. E., C. Benoit, S. Valas, A. G. Silva, G. Perrin, and A. da Silva, 1998: Detection of caprine arthritis encephalitis virus in white blood mononuclear cells and semen of experimentally infected bucks *Vet. Res.* 29(6): 579-584.

- Travassos, C. E., C. Benoit, S. Valas, A. G. Silva, and G. Perrin, 1999: .Caprine arthritis encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. Small Rum. Res. 32(2):101-106.
- Zanoni, R. G., H. R. Vogt, B. Pohl, J. Bottcher, W. Bommeli, and E. Peterhans, 1994: An ELISA based on whole.virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. J. Vet. Med. B 41, 662-669.

CAPÍTULO 4

“INFLUENCE OF CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) ON LIPIDS PROFILE FROM SERUM OF GOATS NATURALLY INFECTED.”

Trabalho a ser submetido ao periódico
American Journal of Veterinary Research

INFLUENCE OF CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS (CAEV) ON LIPIDS PROFILE FROM SERUM OF GOATS NATURALLY INFECTED.

Ana Karina Cunha Callado, MSc;¹ Amanda Soares de Vasconcelos BSc,² Lúcia Sadae Pereira da Costa de Arruda Falcão, BSc;³ Eduardo Jorge Cunha de Oliveira BSc;⁴ Roberto Soares de Castro, PhD;³ Vera Lucia de Menezes Lima, PhD.²

¹ Laboratório de Apoio Animal do MARA – LAPA/RECIFE.. Recife, PE.

² Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica. Recife-PE.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina Veterinária. Recife-PE.

⁴ Médico Veterinário.

SUMMARY

Objective – The aim of this study was to evaluate the influence of CAEV infection in naturally infected goats on serum neutral lipid and lipoprotein cholesterol.

Animals – Thirty female Nubian goats that ranged from 2 to 4 years old were included in the experiment. Fourteen non-infected (serum IDGA negative) and sixteen infected goats. Plasma levels of cholesterol, triglyceride, and lipoprotein-cholesterol were measured and the results from both groups were statistically compared.

Results – Plasma total cholesterol concentrations were significantly ($P=0.003$) higher in the infected animals, in comparison to the non-infected group. High density lipoprotein-cholesterol and very low density lipoprotein-cholesterol from the infected group were slightly increased and decreased, respectively, but the differences were not significant compared with the non-infected group. Also, plasma triglyceride level from the infected group was similar to that from control group. However, in comparison to the control group, low density lipoprotein-cholesterol was significantly ($P=0.004$) increased in the infected animals.

Conclusion and Clinical Relevance – The upper limits of reference ranges for plasma cholesterol and triglyceride concentrations in SRLV infected goats likely reflect high tissue demands for virus replication. Increase in low density lipoprotein-cholesterol in animals infected by CAEV could predispose this group to hypercholesterolemia and to coronary heart disease, particularly important to those post-parturition and involved in the milk production.

INTRODUCTION

Lentiviruses of small ruminant animals, exemplified by maedi-visna virus (MVV) originally isolated from sheep in Iceland, ¹ by ovine progressive pneumonia virus from sheep in the United States, ² and by caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) from North American goats^{3,4} are closely related, but more distantly related to the human lentivirus human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). The lentiviruses are a subfamily of the Retroviridae that are characterized by similarities in ultrastructure, genomic organization, and disease progression. These viruses typically cause chronic, multiorgan diseases that are apparent only months to years after the initial infection. However, most of the infected animals develop no overt symptoms during their lifetime, although infection occurs mainly in the young animal through milk or colostrums infected with the virus. ^{5,6} Nevertheless, other route of virus infection as intrauterine are possible as indicate by previous reports. ^{7,8,9} A hallmark of lentivirus infections is their persistence despite a strong immune response. Infection is followed by a humoral response to the envelope glycoprotein (Env), which is directed against epitopes of the surface (SU) and transmembrane (TM) subunits of Env (for review see ^{10,11}). Cells of the monocyte/macrophage lineage are the principal targets for CAEV infection in vivo and expression of infectious virus is dependent upon cellular differentiation (Narayan, 1983). Virus infection can alter the activity of monocytes and macrophages with respect to cytokine production, possibly downregulation of the production. ^{12,13,14}

The tests frequently used for the diagnosis of the disease are the agar gel immunodiffusion (AGID)^{15,16,17,18} and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).^{19,20}

Plasma lipids, specifically cholesterol and triglycerides, are transported through the circulation to specific tissues for metabolism storage or excretion.

Circulating blood triglycerides contribute significantly to milk fat synthesis.^{21,22,23} Lipids profiles have been used to predict metabolic disturbs, for the diagnosis of metabolic diseases, and for the assessment of the nutritional status of animals. Serum lipids profile and lipoproteins are helpful when interpreted in conjunction with herd history, clinical signs and laboratory tests.

Although lipid metabolism has been studied in human patients infected with HIV, little is know about lipid metabolism in goats infected with SRLV. In the present study, we examined the influence of CAEV on lipids profile from serum of goats.

Material and Methods

Animals – Blood samples were collected from 2426 goats and tested for the presence of CAEV IgG antibodies by AGID test. From all these tested animals it was selected thirty female Nubian goats that ranged from 2 to 4 years old from a dairy herd of Brazilian Northeast. These animals were divided into two groups: the first group included fourteen goats scored negative for CAEV infection and the second group included sixteen scored positive for CAEV infection. They were house under identical conditions and given the same food. The infected animals were clinically healthy at the time of the analyses.

Serum specimens – Samples were withdrawn by puncture of the jugular vein. The samples were placed on ice, and the serum was separated by centrifugation at 2,500 x *g*, for 20 min at 4 °C, then, shipped on ice to the laboratory for lipid analysis.

AGID test – Antigen for the AGID test was prepared as described.¹⁷ Briefly, the supernatants from caprine synovial membrane cell monolayers inoculated with CAEV Cork were harvest at weekly intervals and were then frozen, thawed and centrifuged at 3,300 x *g* for 20 min at 4°C. The clarified supernatants were placed in a dialyzing membrane (INLAB-Ind. Bras.) and concentrated against 10% polyethylene glycol 8000 in PBS at 4°C for 24-48h. The 1/100 concentrated supernatants were titrated against a standard positive serum for CAEV antibodies,

and was stored at -20°C . The test was carried out in 90 mm diameter plastic Petri dishes containing 1.1% agar noble (Difco, USA) in borate buffer (0.05 mol/L NaOH and 0.016 mol/L H_3BO_3). The plates were incubated at room temperature in a humidified chamber for 72 h. The deviation of the reference line or fusion of one or two lines between the sample and antigen wells with the reference line was considered to be a positive result.

Analysis of plasma neutral lipids and lipoprotein concentration – Plasma total cholesterol and triglyceride concentrations were measured by using commercially available reagents (Labtest, Brazil). Plasma cholesterol was determined by the CHOD-PAP method, an enzymatic assay for photometric determination, using the enzymes cholesterol esterase, cholesterol oxidase and peroxidase, according to the manufacturer's instructions. Plasma triglyceride was measured by the GPO-PAP method using a combination of the reactions catalyzed by lipase, glycerokinase, glycerol phosphate oxidase and peroxidase, as described in previous work.²⁴ Plasma VLDL and LDL were precipitated from HDL by the addition of 1.4 mM sodium phosphotungstate with 53.0 mM Magnesium chloride. Serum total cholesterol and HDL-cholesterol in the serum supernatant were quantified as described above. VLDL-cholesterol level was estimated as one-fifth of the concentration of triglyceride,²⁵ and the concentration of LDL-cholesterol was calculated by subtraction of concentration of HDL-cholesterol plus VLDL-C from the total serum cholesterol level.

Statistical analyses – All the analysis were done in duplicate samples. Data are presented as mean $\pm$ SD. Comparison between the groups was performed with Student's t-test. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

Goats infected by CAEV showed abnormality in serum neutral lipids and lipoproteins-cholesterol concentrations (Table 1). The results of this study revealed that the virus infection significantly increased serum total cholesterol concentration, but serum triglyceride level was slightly reduced. It was found an

increase in the concentrations of High density lipoprotein-cholesterol and decreased the very low density lipoprotein-cholesterol but the differences were not significant compared with the non infected (control) group. On the other hand, in comparison to the control group, low density lipoprotein-cholesterol was significantly increased in serum of infected animals.

Besides, the molar ratio of total cholesterol: HDL-cholesterol and LDL-cholesterol : HDL-cholesterol were significantly increased in the infected animals (Table 1). For both groups, a positive correlation was found between the total cholesterol and LDL-cholesterol (Figure1).

Table 1. Plasma neutral lipid and lipoproteins-cholesterol parameters for goats infected by Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV).

			Control (14)	Infected (16)
Neutral lipids	(mmol/l)	Total cholesterol	3.92 ± 0.56	4.75 ± 0.81**
		Triglyceride	0.68 ± 0.08	0.64 ± 0.08
Lipoprotein-cholesterol (mmol/l)		HDL- cholesterol	1.18 ± 0.12	1.23 ± 0.04
		LDL- cholesterol	2.43 ± 0.57	3.23 ± 0.81**
		VLDL- cholesterol	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.04
Cholesterol ratio (mmol/mol)		Total : HDL	3.30 ± 0.52	4.08 ± 0.89*
		LDL : HDL	2.04 ± 0.51	2.60 ± 0.65*

Values significantly different from control animals are shown: * P<0.01; ** P<0.005

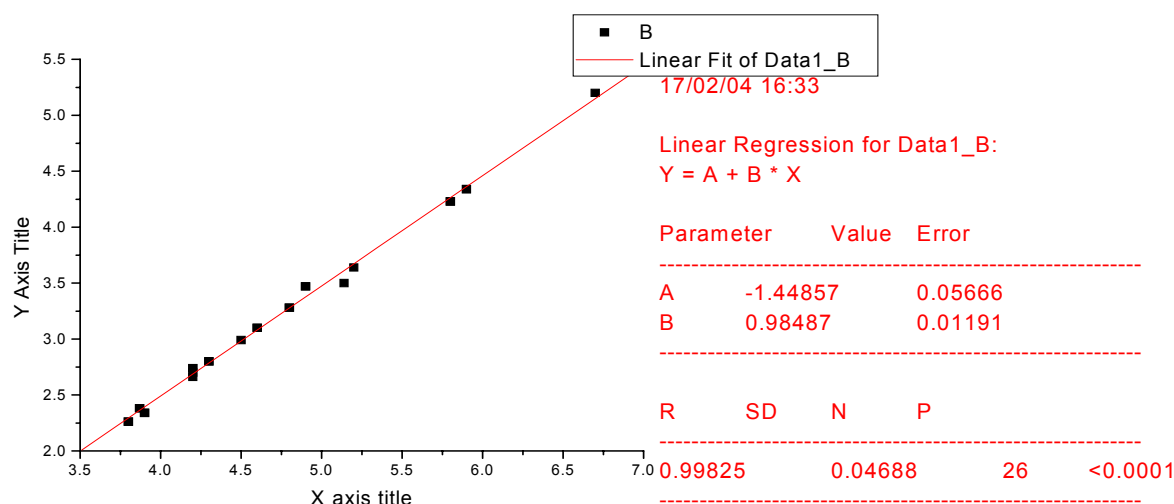


Figure 1: Correlation between the total cholesterol and LDL-cholesterol in goats naturally infected by SRLV.

Discussion

This study provides the first information on the concentration of serum neutral lipids and in lipoprotein-cholesterol in goat infected by CAEV. Lipids have many functions, two of the most important are energy storage and membrane structure. Triacylglycerols are the most important lipid with regard to energy storage, and phospholipids and cholesterol are the most important lipid membrane constituents. Other functions include being precursors for steroids and bile acids (cholesterol), thermal insulation (triacylglycerols) and electrical insulation (for review see ²⁶). Many factors can influence the lipid concentrations in serum and also in the lipoproteins. In human as well as in several other animal species the lipids can varies according to sex, age, diet, pregnancy-stage, and environmental factors. ^{27, 28} To limit such variability, in the present study it was needed to search for CAEV infection in 2426 animals. Having done that, it was selected thirty female Nubian goats that ranged from 2 to 4 years old from a dairy herd of Brazilian Northeast. Sixteen naturally infected and fourteen non-infected,

fed a constant diet and so, with only minor variations in lipid concentrations from serum and lipoproteins between the two groups. It has been reported that in persistent disease caused by some microorganisms, such as *Mycobacterium tuberculosis*, fatty acids can supply cell with energy and precursors for carbohydrate synthesis.³⁰

The viruses have a wide range in pathogenic mechanisms and can cause diseases extending from hyper-acute syndromes that may cause death within two weeks of infection to slowly progressive chronic diseases that may not become apparent until years after initial infection. Lentivirus infections are unusual in that the virus can persist in target cells, even though the host has developed virus-specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies.³¹ Many infected animals are free of clinical signs, possibly by genetics of the animal, management, nutrition, concurrent infections, environmental factors, age at time of infection or re-infection and others.³²

The identification of CAEV infection usually relies on serological tests for the detection of antibodies to CAEV antigens.²⁰ AGID test have been used routinely. The sensitivity and reliability of the serological examination do not only depend on the type of test used, but they may also be influenced by the way the diagnostic antigens have been prepared, the choice of viral strain and by content of immunologically most relevant viral components. The main component of the AGID test is the gp 135 surface glycoprotein. Antigen by the culture of synovial membrane cells has shown sensitivity when tested with CAEV positive and negative goat sera.^{17,20} When testing a large population of animals, CAEV antibodies can be detected efficiently and easily by immunodiffusion in agarose gel.³³ Because the AGID test requires the presence of sufficient antibody to form a visible precipitin line in agar (or deviation of a visible line) they were less sensitive than some other tests.

The levels of serum LDL-cholesterol reported here in CAEV infected-goats are higher than expected on the basis of the results for HDL-cholesterol level. It has been reported that during pregnancy, parturition and lactation the concentration of plasma cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, and VLDL-cholesterol were significantly different. Although, other reports show that cholesterol levels were not significantly different between pre-pregnancy, pregnancy and early lactation periods in multiple lambing ewes.³⁴ Low lipid level

of VLDL are associated with increased lipid levels in LDL and HDL when milk production is at a peak.³⁵ The atherogenic ratio of total cholesterol : HDL-cholesterol was significantly increased.

The cells of the monocyte/macrophage lineage were the major host cells of SRLV replications in vivo¹⁰. Several studies have indicated that circulating monocytes from exhibit an inflammatory response to Gram-negative bacterial LPS (particularly to *P. gingivalis* LPS) releasing large amount of inflammatory mediators and pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α which may be related to hyperlipidemia.^{36,37} Through the action of IL-1 β and TNF- α , exposure to microorganism/endotoxin results in elevated levels of free fatty acids, LDL and cholesterol. Previous report show that Cultured goat macrophages with CAEV results in an alteration of cytokine expression in vitro^{12,13,14}. Constitutive expression of interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) was increased in infected macrophages, whereas transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) mRNA was down-regulated¹³. Furthermore, infection with CAEV led to an altered pattern of cytokine expression in response to lipopolysaccharide (LPS), heat-killed *Listeria monocytogenes* plus gamma interferon, or fixed cells of *Staphylococcus aureus*. In infected macrophages, tumor necrosis factor α , IL-1 β , IL-6, and IL-12 p40 mRNA expression was reduced in response to all stimuli tested whereas changes in expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor depend on the stimulating agent.^{12,13,14} Thus, it is possible that the hyperlipidemia found in the CAEV infected goat was a result of the production of IL-1 β and TNF- α in goat serum. On the other hand, increasing evidence suggest that lipid-bilayer composition of membranes is a critical factor influencing cellular function; the physical/chemical properties of membranes are largely dependent on its integrity, and on the nature of fatty acids within the phospholipids molecules affecting receptor responses and operation of membrane-bound enzyme systems. Hyperlipidemia is thought to be largely responsible for impairments in a variety of cell types. This is significant because, even though in the absence of clinical symptoms of the disease the virus infection induced serum hypercholesterolemia and this may result in cell dysfunction.

Furthermore, there is indication that production of essential polypeptide growth factors such as platelet-derived growth factor, transforming growth factor

β -1, and fibroblast growth factor was significantly inhibited by exposure to LDL/triglyceride levels above the normal physiologic range. This is particularly interestingly, because infected cells of colostrums and milk are responsible for the lactogenic route of CAEV transmission between dams and kid.^{5,6,38}

Conclusion This study demonstrates that in goat the CAEV infection results in plasma dyslipidemia characterized by an imbalance between total cholesterol : HDL-cholesterol and LDL-cholesterol : HDL-cholesterol.

References

¹Sigurdsson B. Maedi: a slow progressive pneumonia progressive of sheep: an epizootiological and pathological study. *Brit Vet J* 1954; 110: 255-270, 1954.

²Lairmore MD, Akita GY, Russel H, DeMartini JC. Replication and cytopathic of ovine lentivirus strains in alveolar correlate with in vivo pathogenicity. *J Virol* 1987; 61(12): 4038-4042.

³Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science* 1980, 207: 997-999.

⁴Narayan O, Clements JE, Strandberg JD, Cork L. C., Griffin, D. E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *J Gen Virol* 1980; 50: 69-79.

⁵Russo P, Vitu C, Bourgogne A, Vignoni M, Abadie G, David V, Pépin M. Caprine Arthritis-Encephalitis virus: detection of proviral DNA in lactoserum cells. *Vet Rec* 1997; 140: 483-484.

⁶Leroux C, Lerondelle, C, Chastang, J, Mornex, J-F. RT-PCR detection of lentiviruses in milk or mammary secretions of sheep or goats from infected flocks. *Vet Res* 1997; 28(2): 115-121.

⁷Cutlip, RC, Lehmkuhl, HD, Jackson, TA. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. *Am J Vet Res* 1981; 42: 1795-1797.

⁸Adams, DS, Klevjer-Anderson, P, Carlson, BS, McGuire, TC. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *Am J Vet Res* 1983; 44: 1670-1675.

⁹Lamara AF, Fieni F, Mselli-Lakhal M, et al. Early embryonic cells from in vivo-produced goat embryos transmit the caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Theriogenology* 2002; 58(6): 1153-1163.

¹⁰Narayan O, Joag SV, Chebloune Y, Zink M C, Clements, J E. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. *Viral Path.*, 1997, p. 657-668. Edited by N. Nathanson. Lippincott-Raven, Philadelphia

¹¹Callado, AKC, Castro, RS, Teixeira, MFS. Lentiviruses of small ruminants (CAEV and Maedi-Visna): a review and perspectives. *Braz J Vet Res* 2001, 21(3): 87-97.

¹²Lechner F, Vogt HR, Seow HF, et al. Expression of TNF α in arthritis caused by caprine arthritis encephalitis virus. *Vet Imm Immunop* 1996; 54: 281-289.

¹³Adeyemo O, Gao RJ, Lan HC. Cytokine production *in vitro* by macrophages of goats with caprine arthritis-encephalitis. *Cel. Mol Biol* 1997; 43(7): 1031-1037.

¹⁴Lechner F, Machado J, Bertoni G, et al. Caprine Arthritis Encephalitis Virus Dysregulates the Expression of Cytokines in Macrophages. *J Virol* 1997; 71(10): 7488-7497.

¹⁵Cutlip RC, Jackson TA, Laird GA. Immunodiffusion test for ovine progressive pneumonia. *Am J Vet Res* 1977; 38: 1081-1084.

¹⁶Adams DS, Gorham, JR. The gp 135 of caprine arthritis-encephalitis virus affords greater sensitivity than the p 28 in immunodiffusion serology. *Res Vet Sci* 1986; 40: 157-160.

¹⁷Abreu SRO, Castro RS, Nascimento SA, Souza MG. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus maedi-visna para utilização em teste de imunodifusão em agar-gel. *Pesq Vét Brás* 1998, 18(2): 57-60.

¹⁸Celer Jr V, Celer V, Němcová H, et al. Serologic diagnosis of ovine lentiviruses by whole virus ELISA and AGID test. *J vet Med B* 1998; 45: 183-188.

¹⁹Schroeder BA, Oliver RE, Cathcart A. The development and evaluation of an ELISA for detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goat serum. *N Z Vet J* 1985; 33: 213-219.

²⁰Castro, RS, Leite, RC, Resende, M, et al. A labelled avidin-biotin ELISA to detect antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus in goats' sera. *Vet Res Comm* 1999; 23: 515-522.

²¹Barry JM, Bartley W, Linzell JL, et al. Uptake from the blood of triglyceride fatty acids of chylomicra and lipoproteins by the mammary gland of the goat. *Biochem J* 1963; 89: 6.

²²Bishop C, Davies T, Glascock RF, et al. Studies on the origin of milk fat. *Biochem J* 1969; 113: 629.

²³Annison EF, Linzell JL, Frazakerely S, et al. The oxidation and utilization of palmitate, stearate, oleate and acetate by the mammary gland of the fed goat in relation to their overall metabolism, and the role of plasma phospholipids and neutral lipids in milk fat synthesis. *Biochem J* 1967; 102: 637.

²⁴Sena VLM, Srivastava RM, Oliveira SO, et al. Microwave assisted synthesis of N-arylphthalamic acids with hyperlipidemic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 2671-2674.

²⁵Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499.

²⁶Bruss ML. Lipids and Ketones. In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Edit Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Academic Press, San Diego, 1997.

²⁷Butterwick RF, McConnell M, Markwell PJ, et al. Influence of age and sex on plasma lipid and lipoprotein concentrations and associated enzyme activities in cats. *Am J Vet Res* 2001; 62: 331-336.

²⁸Gillett MPT, Lima VLM. Marked decrease in plasma cholesterol concentration with increasing age in male lizards. *Atherosclerosis* 1979; 32: 461-463.

³⁰Bishai W. Lipid lunch for persistent pathogen. *Nature* 2000; 406: 683-685.

³¹Narayan O, Clements J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *J Gen Virol* 1989; 70: 1617-1639.

³²Adams DS. The meaning of the Agar Gel Immunodiffusion test (AGID) for antibody against caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Dairy Goat J* 1982; 60(9): 17-18.

³³Sihvonen L, Nuotio L, Rikula U, et al. Preventing the spread of maedi-visna in sheep through a voluntary control programme in Finland. *Prev Vet Med* 200; 47: 213-220.

³⁴Ozpinar A, Firat A. Metabolic profile of pre-pregnancy, pregnancy and early lactation in multiple lambing Sakiz ewes. 2. Changes in plasma progesterone, estradiol-17beta and cholesterol levels. *J Vet Med A* 2002; 49(1): 9-12.

³⁵Raphael BC, Dimick PS, Puppione DL. Lipids characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *J Dairy Sci* 1973; 56: 1025-1032.

³⁶Jovinge S, Ares M, Kallin B, Nilsson J. Human monocytes/macrophages release TNF- α in response to ox-LDL. *Arterioscler Thromb Biol* 1996; 16: 1576-1579.

³⁷Craig TE, Jackson RL, Ohlweiler DF, KU G. Multiple lipid oxidation products in low density lipoproteins induce interleukin-1 beta release from human blood mononuclear cells. *J Lipid Res* 1994; 35: 417-427.

³⁸Mseli-Lakhal L, Guiguen F, Fornazero C, et al. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. *Virol* 1999, 259: 67-73.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

O aproveitamento dos explantes de MS dos carpos de fetos caprinos forneceu rendimento maior de garrafas de cultura celular por feto caprino, possibilitando a utilização, para replicação viral, de células nas primeiras passagens.

As culturas celulares primárias mostraram-se permissíveis à replicação das amostras padrão CAEV Cork e Maedi-Visna K1514.

A amostra BrMg2-03 replicou mais eficientemente que a BrPe1-01, sugerindo uma melhor capacidade de adaptação em cultivo celular.

Os SRLV ainda representam problema sanitário para o rebanho de Pernambuco necessitam que as medidas de controle efetivas sejam adotadas.

Caprinos infectados por SRLV apresentam dislipidemia caracterizada por um desequilíbrio entre colesterol total, colesterol da LDL e colesterol da HDL.

ANEXOS

6. Anexos

- 6.1. – Author Gateway for Journal of Virological Methods;
- 6.2. – Author Gateway for Small Ruminants Research;
- 6.3. – Author Gateway for Journal of Veterinary Medicine Series B;
- 6.4. – Author Gateway for American Journal of Veterinary Research;
- 6.5 – XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária;
- 6.6. – XI Congresso Latino-americano de Buiatria.



Guide for Authors

There are different Instructions to Authors for [VIROLOGY PROTOCOLS](#). These are printed following the regular Instructions to Authors, next.

Submission of a paper to the *Journal of Virological Methods* implies that it has not previously been published (except in abstract form) and that it is not being submitted for publication elsewhere. The authors are requested to transfer their copyright to the Publisher, to ensure the widest possible dissemination of information.

Papers and original figures should be submitted together with two copies and accompanied by a letter of transmittal to the Editor-in-Chief: Professor Arie J. Zuckerman, MD, DSc, FRCP, FRC Path, WHO Center-Viral Diseases, The Royal Free Hospital School of Medicine, University of London, Rowland Hill Street, Hampstead, London NW3 2PF, United Kingdom. Tel: +44 207 830 2579, Fax: +44 207 830 2070.

Submission of Manuscripts The preferred medium of final submission to the accepting Editor is on disk with the accompanying reviewed and revised manuscript (see 'Electronic manuscripts' below).

Manuscripts, in English, should be typed on one side of the paper only with double spacing and wide margins, and should have a separate titlepage bearing author(s) names and affiliations as well as an address for correspondence, and a telephone number as well as a fax number if available for immediate enquiry.

Research articles should generally not exceed 25 typewritten pages and should be divided into Summary (on a separate sheet and not exceeding 200 words, followed by 3-6 keywords). Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References.

Short communications, approx. 12 typewritten pages, with a Summary and keywords but without section headings.

Book reviews or meeting reports will be published following invitation from, or by authors first contacting, the Editor-in-Chief.

Electronic manuscripts: Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs. The preferred storage medium is a 5 1/4 or 3 1/2 inch disk in MS-DOS format, although other systems are welcome, e.g., NEC and Macintosh (in this case, save your file in the usual manner, do not use the option "save in MS-DOS format"). Please **do not split** the article into separate files (titlepage as one file, text as another, etc.). Ensure that the letter "l" and digit "1" (also letter 'O' and digit '0') have been used properly, and structure your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your wordprocessor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open but indicated by a unique code (e.g., α , @, #, etc., for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your wordprocessor to introduce word splits and do not use a "justified" layout. Please adhere strictly to the general instructions on style/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. It is very important that you save your file in the wordprocessor format. If your wordprocessor features the option to save files "in flat ASCII", please do **not** use it.

Reproduction in colour will have to be approved by the Editor(s) and Publisher. The extra cost

of colour reproduction will be charged to the author(s). Each illustration must have a legend, which should be typed with double spacing on a separate page and begin with the number of the illustration it refers to.

Amino acid sequences, gene maps, etc., should be submitted as figures.

Virus Nomenclature: Authors are requested to follow the guidelines of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), as mentioned in Vol. 29 (1996) pp 1-2. The complete report of the ICTV (The Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the ICTV, Murphy, F.A. et al., 1995) is available from Springer-Verlag.

References should be assembled in alphabetical order on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should accord with the following examples:

Kit, S., Kit, M., Ichimura, H., Crandell, R. and McConnell, S., 1986. Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res.* 4, 197-212. Howard, C.R., 1986. Arenaviruses. *Perspectives in Medical Virology*, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam.

Vogel, S.N. and Friedman, R.M., 1984. Interferon and macrophages: activation and cell surface changes. In: J. Vilcek and E. De Maeyer (Eds), *Interferons and the Immune System*. Interferon, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, pp. 35-59.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations (available from International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France; ISBN 2-904939-02-8).

Please note that the responsibility for the accuracy and completeness of literature references lies solely with the author(s).

Proofs will be sent to the first-named author of an article, unless an alternative is requested on the title page of the manuscript. They should be checked carefully and returned by airmail within 2 days of receipt. Only printer's errors may be corrected: no changes in or additions to the edited manuscript will be allowed at this stage. The Publisher will proceed if proofs are not received on time.

Page charges will not be made. **Reprints** may be ordered by filling in and returning to the Publishers the order form sent to the authors: per contribution 50 reprints will be made available free of charge. **Submission of manuscripts** Manuscripts should be complete in all respects (and be submitted on disk and in triplicate including three copies of all illustrations - see Manuscripts below). Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the manuscript shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. Submission of a paper to **Virology Protocols** is understood to imply it is not being considered for publication elsewhere.

Editorial Address: Manuscripts should be submitted to:

Professor Arie J. Zuckerman, MD, DSc, FRCP, FRC Path, WHO Center-Viral Diseases, The Royal Free Hospital School of Medicine, University of London, Rowland Hill Street, Hampstead, London NW3 2PF, United Kingdom. Tel: +44 207 830 2579, Fax: +44 207 0302070.

Correspondence relating to proofs, publication and reprints should be sent to: Issue Manager, Virology Protocols, Elsevier Science Ireland Ltd., Bay 15, Shannon Industrial Estate, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel: +353 61 471944, Fax: +353 61 472144

Manuscripts: The medium of final submission is on disk with accompanying revised manuscript (see **Electronic manuscripts** below). Manuscripts should be written in grammatical English and be accompanied by an abstract, theme, topic, and 3 - 6 key words on

a separate page. As well as the disk copy, three printout copies of each manuscript should be submitted in double-spaced typing with at least a 4 cm margin on pages of uniform size. Protocols should be divided into numbered sections headed by a caption (Abstract; 1. Type of research; 2. Time required; 3. Materials; 4. Detailed procedure; 5. Results; 6. Discussion; 7. Essential references; 8. References; 9. Quick procedure). The order of subdivision within sections is as follows: Arabic numerals (e.g. 3.1.), lower case Roman characters (a, b etc.). Listings should be indicated by dashes. In order to ensure timely publication, no revisions or updating will be incorporated after the manuscript has been accepted and sent to the Publisher.

Electronic manuscripts. Electronic manuscripts have several advantages: there is no need for the re-keying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs. The preferred storage medium is a 3.5 inch disk in MS-DOS format, although other systems are also supported, eg NEC and Macintosh (in the latter case, save your file in the usual manner, do not use the option "save in MS-DOS format"). After final acceptance, your disk plus one final, printed and exactly matching version (as a printout) should be submitted together to the Editor. It is important that the file on disk and the printout are identical. Please specify the type of computer and word processing package used (do not convert your text file to plain ASCII). Ensure that the letter "l" and the digit "1" (also letter "O" and digit "0") have been used properly, and format your article (tabs, indents, etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but indicated by a unique code (e.g. galpha, @, etc. for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your word processor to introduce word splits and do not use a "justified" layout. Please adhere strictly to the general instructions on styles/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. Tables and illustrations will be handled conventionally; the latter should be submitted as original drawings or glossy prints. Further information may be obtained from the publisher.

Organization of a Protocol

Title page: The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding author (including telephone number, facsimile number and electronic mail address); (vi) acknowledgements.

Abstract: This should provide a concise description of the purpose of the Protocol and should not exceed 200 words.

Keywords: Please provide 3 - 6 keywords.

1. Type of research. In this section, relevant published studies should be described concisely in list form preceded by Roman lower case numeral characters. The published studies should be appropriately cited.

2. Time required. An estimation of the time required to run the protocol should be given per separate step and for the whole protocol

3. Materials. The materials used should be described in sufficient detail for the protocol to be replicated. Animals used should include information on breed, breeder, sex, age, weight and the maintenance conditions. Furthermore, this section should be divided into two subsections: (i) Special equipment and (ii) Chemicals and reagents. Any special equipment required should be mentioned, including details of model type/number and (international) supplier. The source or supplier of any special equipment should also be stated, in parentheses, after mentioning the equipment for the first time. A listing (preceded by dashes) of chemicals and reagents used in the protocol, should be provided, if applicable. Special chemicals and drugs with their sources or suppliers should be grouped under a separate subheading ("Chemicals" or "Drugs"). For drugs, generic names should be used; trade names may be given in brackets where the drug is first mentioned. In case of new drugs or chemicals, a full chemical description (formula) should be given. The form of the drug used should be indicated.

4. Detailed procedure. This section should include an extensive, detailed and stepwise description of the procedures used. The individual steps should be described in list form preceded by Roman lower case numeral characters and correspond with the steps described under Quick procedure. All companies from which chemicals or materials were obtained should be listed with their full address.

5. Results. In this section the expected results should be described clearly and concisely, and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

6. Discussion. This section should present an assessment of the protocol, problems which may be encountered, and alternative or support protocols.

This section should be divided into two parts: (i) Trouble-shooting and (ii) Alternative and

Support Protocols. Troubleshooting: Problems that may have been encountered during any of the procedures should be discussed clearly and concisely, and suitable solutions suggested. Alternative methods for replacing certain steps in the protocol should be mentioned in sufficient detail, and clearly indicating at which point in the protocol they should be applied. Alternative and Support Protocols: If applicable, alternative or support protocols should be mentioned, clearly stating the advantages and disadvantages of such protocols and be accompanied by appropriate citation of the literature.

7. Essential literature references. This should mention certain essential reading divided into original papers, book chapters and review papers. Do not cite the full reference, but just list the reference number. The total number of references in this section should not exceed ten.

8. Literature references. Citation of literature references in the text should be given at the appropriate places using name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc, placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be followed by et al. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page (also double-spaced) arranged in alphabetical order of first author. They should consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. The abbreviations of journal titles should conform to those adopted by List of Serial Title Word Abbreviations, CIEPS/ISDS, Paris, 1985 (ISBN 2904939-02-8). Periodicals, books and multi-author books should accord with the following examples:

Examples:

Mainan, O.V., Cromeans, T.L. and Margolis, H.S., 1996. Sequence-specific, single-primer amplification and detection of PCR products for identification of hepatitis viruses, *J. Virol. Meth* 127-134.

Bentz, J., 1993. *Viral Fusion Mechanisms*, CRC Press, Boca Raton, FL, 529.

Britt, W.J., 1994. Infections associated with human cytomegalovirus. In R. Glaser and J.F. Jones (Eds.) *Herpesvirus Infections*, Marcel Dekker, New York, pp. 59-116.

9. Quick procedure. This section should describe the protocol in a concise, stepwise manner. The individual steps should be described in list form preceded by roman lower case numeral characters and correspond with the steps described under Detailed procedure. This section should contain basic, essential information for the protocol to be replicated successfully.

Illustrations must be submitted in triplicate as unmounted glossy photographs and reach the Editor in a form and condition suitable for reproduction. If figures are not to be reduced in size their format should not exceed 13 X 20 cm. Lettering should be clear and of adequate size to be legible after reduction (2 - 6 mm). Professional lettering is preferred, but if this is not possible, an overlay displaying the desired labelling, should be provided with the figures. Please note that so-called press-on lettering should be avoided since this is likely to get damaged during handling and photographic processing of the prints. Slides taken from labelled prints are also acceptable.

The illustrations should bear the author's name, the orientation (top, bottom etc.) and be numbered in Arabic numerals according to the sequence of appearance in the text, where they are referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc.

Line drawings should be in black ink on drawing or tracing paper or glossy sharp photographs of the same.

Photographs should be supplied as clear black-and-white prints on glossy paper, rather than copies which reproduce detail badly.

Micrographs should have a scale bar, rather than a magnification factor, in the legend. The degree of reduction will be determined by the Publisher, but in general it should be assumed that the same degree of reduction will be applied to all figures in the same paper.

If illustrations or other small parts of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to Virology Protocols, the written permission of author and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Colour reproduction: Reproduction in colour will have to be approved by the Editor. The extra cost of colour reproduction will be charged to the author(s). Colour figures should be submitted as separate prints and not be mounted on cardboard.

Figure Legends: Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be typed with double-spacing on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the Figure must

be explained.

Tables should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text. Tables of numerical data should each be typed (also with double-spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.) and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc. The title of the Table should appear above the Table. A detailed description of its contents and footnotes should be given below the body of the Table (identified with a, b, c, etc.).

Proofs: Authors should keep a copy of their manuscripts as proofs will be sent to them with out the manuscript. Proofs will usually be drawn on lower quality paper. Only printer's errors may be corrected. No change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. The author proofs must be returned within 48 h after receipt, preferably by fax or electronic mail to facilitate speedy publication. If the Publisher receives no reply after approximately 15 days, the assumption will be made that there are no errors to correct and the article will be published.

Reprints: A total of 25 reprints of each paper will be provided free of charge to the author(s). Additional copies can be ordered at prices shown on the reprint order form which will be sent to the author upon receipt of the accepted manuscript at Elsevier.

Page charge: There will be no page charge for Virology Protocols.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Reproduction in colour will have to be approved by the Editor(s) and Publisher. The extra cost of colour reproduction will be charged to the author(s). Each illustration must have a legend, which should be typed with double spacing on a separate page and begin with the number of the illustration it refers to.

Amino acid sequences, gene maps, etc., should be submitted as figures.

Virus Nomenclature: Authors are requested to follow the guidelines of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), as mentioned in Vol. 29 (1996) pp 1-2. The complete report of the ICTV (The Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the ICTV, Murphy, F.A. et al., 1995) is available from Springer-Verlag.

References should be assembled in alphabetical order on a separate sheet. In the text they should be referred to by name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc., placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be given followed by et al. Literature references must consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. Periodicals, books and multi-author books should accord with the following examples:

Kit, S., Kit, M., Ichimura, H., Crandell, R. and McConnell, S., 1986. Induction of thymidine kinase activity by viruses with group B DNA genomes: bovine cytomegalovirus (bovine herpesvirus 4). *Virus Res.* 4, 197-212.

Howard, C.R., 1986. Arenaviruses. *Perspectives in Medical Virology*, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam.

Vogel, S.N. and Friedman, R.M., 1984. Interferon and macrophages: activation and cell surface changes. In: J. Vilcek and E. De Maeyer (Eds), *Interferons and the Immune System*. Interferon, Vol. 2, Elsevier, Amsterdam, pp. 35-59.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by *List of Serial Title Word Abbreviations* (available from International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002

Paris, France; ISBN 2-904939-02-8).

Please note that the responsibility for the accuracy and completeness of literature references lies solely with the author(s).

Proofs will be sent to the first-named author of an article, unless an alternative is requested on the title page of the manuscript. They should be checked carefully and returned by airmail within 2 days of receipt. Only printer's errors may be corrected: **no changes** in or additions to the edited manuscript will be allowed at this stage. The Publisher will proceed if proofs are not received on time.

Page charges will not be made.

Reprints may be ordered by filling in and returning to the Publishers the order form sent to the authors: per contribution 50 reprints will be made available free of charge.

Virology Protocols

Virology Protocols is a new feature within the *Journal of Virological Methods* containing articles providing detailed descriptions of new and established techniques used in virological laboratories. The overriding criteria for publication are significant methodological and experimental relevance and interest to a multidisciplinary audience.

Submission of manuscripts Manuscripts should be complete in all respects (and be submitted on disk and in triplicate including three copies of all illustrations - see **Manuscripts** below). Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed on the assumption that all listed authors concur with the submission and that a copy of the final manuscript has been approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities in the laboratories where the work was carried out. If accepted, the manuscript shall not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editors and Publisher. Submission of a paper to **Virology Protocols** is understood to imply it is not being considered for publication elsewhere.

Editorial Address: Manuscripts should be submitted to:

Professor Arie J. Zuckerman, MD, DSc, FRCP, FRC Path, WHO Center-Viral Diseases, The Royal Free Hospital School of Medicine, University of London, Rowland Hill Street, Hampstead, London NW3 2PF, United Kingdom. Tel: +44 207 830 2579, Fax: +44 207 0302070.

Correspondence relating to proofs, publication and reprints should be sent to:

Issue Manager, Virology Protocols, Elsevier Science Ireland Ltd., Bay 15, Shannon Industrial Estate, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel: +353 61 471944, Fax: +353 61 472144

Manuscripts: The medium of final submission is on disk with accompanying revised manuscript (see **Electronic manuscripts** below). Manuscripts should be written in grammatical English and be accompanied by an abstract, theme, topic, and 3 - 6 key words on a separate page. As well as the disk copy, three printout copies of each manuscript should be submitted in double-spaced typing with at least a 4 cm margin on pages of uniform size. Protocols should be divided into numbered sections headed by a caption (Abstract; 1. Type of research; 2. Time required; 3. Materials; 4. Detailed procedure; 5. Results; 6. Discussion; 7. Essential references; 8. References; 9. Quick procedure). The order of subdivision within sections is as follows: Arabic numerals (e.g. 3.1.), lower case Roman characters (a, b etc.). Listings should be indicated by dashes. In order to ensure timely publication, no revisions or updating will be incorporated after the manuscript has been accepted and sent to the Publisher.

Electronic manuscripts. Electronic manuscripts have several advantages: there is no need for the re-keying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs. The preferred storage medium is a 3.5 inch disk in MS-DOS format, although other systems are also supported, eg NEC and Macintosh (in the latter case, save your file in the usual manner, do not use the option "save in MS-DOS format"). After final acceptance, your disk plus one final, printed and exactly matching version (as a printout) should be submitted together to the Editor. It is important that the file on disk and the printout are identical. Please specify the type of computer and word processing package used (do not convert your text file to plain ASCII). Ensure that the letter "l" and the digit "1" (also letter "O" and digit "0") have been used properly, and format your article (tabs, indents,

etc.) consistently. Characters not available on your word processor (Greek letters, mathematical symbols, etc.) should not be left open, but indicated by a unique code (e.g. α , @, etc. for the Greek letter α). Such codes should be used consistently throughout the entire text. Please make a list of such codes and provide a key. Do not allow your word processor to introduce word splits and do not use a "justified" layout. Please adhere strictly to the general instructions on styles/arrangement and, in particular, the reference style of the journal. Tables and illustrations will be handled conventionally; the latter should be submitted as original drawings or glossy prints. Further information may be obtained from the publisher.

Organization of a Protocol

Title page: The title page should contain the following items: (i) complete title (preferably no chemical formulas or arbitrary abbreviations); (ii) full names of all authors; (iii) complete affiliations of all authors; (iv) the number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables) and the number of figures and tables; (v) the name and complete address of the corresponding author (including telephone number, facsimile number and electronic mail address); (vi) acknowledgements.

Abstract: This should provide a concise description of the purpose of the Protocol and should not exceed 200 words.

Keywords: Please provide 3 - 6 keywords.

1. Type of research. In this section, relevant published studies should be described concisely in list form preceded by Roman lower case numeral characters. The published studies should be appropriately cited.

2. Time required. An estimation of the time required to run the protocol should be given per separate step and for the whole protocol

3. Materials. The materials used should be described in sufficient detail for the protocol to be replicated. Animals used should include information on breed, breeder, sex, age, weight and the maintenance conditions. Furthermore, this section should be divided into two subsections: (i) Special equipment and (ii) Chemicals and reagents. Any special equipment required should be mentioned, including details of model type/number and (international) supplier. The source or supplier of any special equipment should also be stated, in parentheses, after mentioning the equipment for the first time. A listing (preceded by dashes) of chemicals and reagents used in the protocol, should be provided, if applicable. Special chemicals and drugs with their sources or suppliers should be grouped under a separate subheading ("Chemicals" or "Drugs"). For drugs, generic names should be used; trade names may be given in brackets where the drug is first mentioned. In case of new drugs or chemicals, a full chemical description (formula) should be given. The form of the drug used should be indicated.

4. Detailed procedure. This section should include an extensive, detailed and stepwise description of the procedures used. The individual steps should be described in list form preceded by Roman lower case numeral characters and correspond with the steps described under Quick procedure. All companies from which chemicals or materials were obtained should be listed with their full address.

5. Results. In this section the expected results should be described clearly and concisely, and in logical order without extended discussion of their significance. Results should usually be presented descriptively and be supplemented by photographs or diagrams.

6. Discussion. This section should present an assessment of the protocol, problems which may be encountered, and alternative or support protocols.

This section should be divided into two parts: (i) *Trouble-shooting* and (ii) *Alternative and Support Protocols*. *Troubleshooting*: Problems that may have been encountered during any of the procedures should be discussed clearly and concisely, and suitable solutions suggested. Alternative methods for replacing certain steps in the protocol should be mentioned in sufficient detail, and clearly indicating at which point in the protocol they should be applied. *Alternative and Support Protocols*: If applicable, alternative or support protocols should be mentioned, clearly stating the advantages and disadvantages of such protocols and be accompanied by appropriate citation of the literature.

7. Essential literature references. This should mention certain essential reading divided into original papers, book chapters and review papers. Do not cite the full reference, but just list the reference number. The total number of references in this section should not exceed ten.

8. Literature references. Citation of literature references in the text should be given at the appropriate places using name and year (Harvard System). More than one paper from the same author in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc, placed after the year of publication. In the text, when referring to a work by more than two authors, the name of the first author should be followed by et al. All references cited in the text should be listed at the end of the manuscript on a separate page (also double-spaced) arranged in alphabetical order of first author. They should consist of names and initials of all authors, year, title of paper referred to, abbreviated title of periodical, volume number and first and last page numbers of the paper. The abbreviations of journal titles should conform to those adopted by

List of Serial Title Word Abbreviations, CIEPS/ISDS, Paris, 1985 (ISBN 2904939-02-8). Periodicals, books and multi- author books should accord with the following examples:

Examples:

Mainan, O.V., Cromeans, T.L. and Margolis, H.S., 1996. Sequence-specific, single-primer amplification and detection of PCR products for identification of hepatitis viruses, *J. Virol. Meth* 127-134.

Bentz, J., 1993. *Viral Fusion Mechanisms*, CRC Press, Boca Raton, FL, 529.

Britt, W.J., 1994. Infections associated with human cytomegalovirus. In R. Glaser and J.F. Jones (Eds.) *Herpesvirus Infections*, Marcel Dekker, New York, pp. 59-116.

9. Quick procedure. This section should describe the protocol in a concise, stepwise manner. The individual steps should be described in list form preceded by roman lower case numeral characters and correspond with the steps described under Detailed procedure. This section should contain basic, essential information for the protocol to be replicated successfully.

Illustrations must be submitted in triplicate as unmounted glossy photographs and reach the Editor in a form and condition suitable for reproduction. If figures are not to be reduced in size their format should not exceed 13 X 20 cm. Lettering should be clear and of adequate size to be legible after reduction (2 - 6 mm). Professional lettering is preferred, but if this is not possible, an overlay displaying the desired labelling, should be provided with the figures. Please note that so-called press-on lettering should be avoided since this is likely to get damaged during handling and photographic processing of the prints. Slides taken from labelled prints are also acceptable.

The illustrations should bear the author's name, the orientation (top, bottom etc.) and be numbered in Arabic numerals according to the sequence of appearance in the text, where they are referred to as Fig. 1, Fig. 2, etc.

Line drawings should be in black ink on drawing or tracing paper or glossy sharp photographs of the same.

Photographs should be supplied as clear black-and-white prints on glossy paper, rather than copies which reproduce detail badly.

Micrographs should have a scale bar, rather than a magnification factor, in the legend. The degree of reduction will be determined by the Publisher, but in general it should be assumed that the same degree of reduction will be applied to all figures in the same paper.

If illustrations or other small parts of articles or books already published elsewhere are used in papers submitted to **Virology Protocols**, the written permission of author and publisher concerned must be included with the manuscript. The original source must be indicated in the legend of the illustration in these cases.

Colour reproduction: Reproduction in colour will have to be approved by the Editor. The extra cost of colour reproduction will be charged to the author(s). Colour figures should be submitted as separate prints and not be mounted on cardboard.

Figure Legends: Each illustration must have a title and an explanatory legend. The title should be part of the legend and not be reproduced on the figure itself. The legends should be typed with double-spacing on a separate page at the end of the manuscript and begin with the number of the illustration they refer to. All symbols and abbreviations used in the Figure must be explained.

Tables should be so constructed that they, together with their captions and legends, will be intelligible with minimal reference to the text. Tables of numerical data should each be typed (also with double-spacing) on a separate page, numbered in sequence in Arabic numerals (Table 1, 2, etc.) and referred to in the text as Table 1, Table 2, etc. The title of the Table should appear above the Table. A detailed description of its contents and footnotes should be given below the body of the Table (identified with a, b, c, etc.).

Proofs: Authors should keep a copy of their manuscripts as proofs will be sent to them with out the manuscript. Proofs will usually be drawn on lower quality paper. Only printer's errors may be corrected. No change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. The author proofs must be returned within 48 h after receipt, preferably by fax or electronic mail to facilitate speedy publication. If the Publisher receives no reply after approximately 15 days, the assumption will be made that there are no errors to correct and the article will be published.

Reprints: A total of 50 reprints of each paper will be provided free of charge to the author(s). Additional copies can be ordered at prices shown on the reprint order form which will be sent

to the author upon receipt of the accepted manuscript at Elsevier.

Page charge: There will be no page charge for **Virology Protocols**.

print page

close window

author GATEWAY

[Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Contact Us](#)

© 2004 Elsevier L



Guide for Authors

Types of contribution

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Technical Notes
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews
6. Clinical Case Reports

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Technical Note* is a concise, but complete, description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Technical Notes should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal, within 4 months preceding the most current issue, are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. The Editor-in-Chief also reserves the right to edit or shorten submitted letters that are accepted for publication. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Please submit the original letter and one copy directly to the Editor-in-Chief:

Professor Jean Boyazolgu
Editor-in-Chief
Small Ruminant Research
20 Cours Albert 1er
75008 Paris
France

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old. Book reviews will be solicited. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Editor-in-Chief.

Clinical Case Reports should document a case or series of cases that are of special interest because of an unusual presentation, treatment, and/or diagnostic tool. Discussions should cite sufficient literature to show that the reports are truly unique. They should be as completely documented, both by reference to the literature and description of any experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 5 printed pages (about 10 manuscript pages, including figures, tables and references).

Submission of manuscripts

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved

the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of an article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Papers for consideration should be submitted in triplicate to:

The Editorial Office of *Small Ruminant Research*

P.O. Box 993

1000 AZ Amsterdam

The Netherlands

Fax: +31 20 485 3881

E-mail: health-eo@elsevier.com

Authors should indicate for which section of the journal (Genetics; Health; Nutrition; Lactation; Physiology; Production) they would like the manuscript to be considered.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. **Authors whose native language is not English are recommended to seek the help of an English speaking colleague before submitting their manuscripts.**

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Japan will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (*before submission*). Please contact our Tokyo office: Elsevier Japan, 1-9-15, Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan; Tel. (+81) 3-5561-5032; Fax: (+81) 3-5561-5045; E-mail:

info@elsevier.co.jp

2. Submit **the original and two copies** of your manuscript. Enclose the original illustrations and two sets of photocopies (three prints of any photographs) and two return address labels.

3. Manuscripts should be typewritten, typed on one side of the paper (**with numbered lines, not to exceed 25 lines per page**), with wide margins of 3-4 cm and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered in the upper right-hand corner.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

4. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliation(s)

Full telephone and fax numbers, and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address (including postal or zip code) and e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (maximum 5). Please refer to the cumulative indexes (Vol. 50, Issue 3).

Introduction, including previous literature and purpose of study

Material studied, area descriptions, methods, techniques, description of animals, climate in field studies, statistical analyses

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

5. In typing the manuscript, titles and subtitles should not be run on within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

6. SI units should be used (international metric standards).

7. If a special instruction to the copy editor or typesetter is written on the copy it should be encircled. The typesetter will then know that the enclosed matter is not to be set in type.

When a typewritten character may have more than one meaning (e.g. the lower case letter l may be confused with the numeral 1), a note should be inserted in a circle in the margin to make the meaning clear to the typesetter. If Greek letters or uncommon symbols are used in the manuscript, they should be written very clearly, and if necessary a note such as "Greek lower-case chi" should be put in the margin and encircled.

8. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision manuscripts and

illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Electronic manuscripts

Electronic manuscripts have the advantage that there is no need for the rekeying of text, thereby avoiding the possibility of introducing errors and resulting in reliable and fast delivery of proofs.

For the initial submission of manuscripts for consideration, hardcopies are sufficient. For the processing of **accepted papers**, electronic versions are preferred. After **final acceptance**, your disk plus two, final and exactly matching printed versions should be submitted together. Double density (DD) or high density (HD) diskettes (3.5 or 5.25 inch) are acceptable. It is important that the file saved is in the native format of the wordprocessor program used. Label the disk with the name of the computer and wordprocessor package used, your name, and the name of the file on the disk. Further information may be obtained from the Publisher.

Abstracts

1. All articles should start with an abstract in English. The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words.
2. The abstract should state briefly and specifically what the paper reports, summarize conclusions, point out new information and indicate the relevance of the work. **The abstract should be able to stand as an independent entity.**

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table. Tables should be as simple and as few as possible.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Drawn tables, from which prints need to be made, should not be folded.
4. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
5. Each table should be typewritten on a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
6. Each table should have a brief and self-explanatory title.
7. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
8. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
9. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted separately, unmounted and not folded.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Each illustration should be identified on the reverse side (or, in the case of line drawings, on the lower front side) by its number and the name of the first author. An indication of the top of the illustrations is required in photographs of profiles, thin sections, and other cases where doubt can arise.
4. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
5. Lettering should be in Indian ink or by printed labels. Make sure that **the size of the lettering is big enough to allow a reduction of 50 %** without becoming illegible. The lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
6. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.
7. Each illustration should have a caption. **The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.**
8. Explanations should be given in the typewritten legend. Drawn text in the illustrations

should be kept to a minimum.

9. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed cannot be accepted.

10. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, Elsevier will ensure that these figures appear free-of-charge in colour in the electronic version of your paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

11. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL:

<http://authors.elsevier.com/artwork> .

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect:

<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data are provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit the [journal's home page](#) and click on the left-hand side link to the Author Gateway.

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the authors' name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..."; "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list, names of the first author and all co-authors should be detailed.

4. **References cited together in the text should be arranged chronologically.** The list of references should be arranged alphabetically by first authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors, the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Greyling, J.P.C., van der Nest, M., Schwalbach, L.M.J., Muller, T., 2002. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. *Small Rumin. Res.* (43) 45-51.

b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*

Morand-Fehr, P., Richard, A., Tessier, J., Hervieu, J., 2002. Effects of decoquinate on the growth and milk performance of young female goats. In: Robinson, A., Sherman, D. (Eds), *Sheep and Goat Diseases and Productivity*. *Small Rumin. Res.* (45) 109-114.

c. *For books*

McDowell, L.R., 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition*, Second Edition, Elsevier, Amsterdam, 644 pp.

d. *For multi-author books*

Beynen, A.C., Festing, M.F.W., van Montfort, M.A.J., 2001. Design of animal experiments. In: Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V., Beynen, A.C. (Eds), *Principles of Laboratory Animal Science*, Revised Edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 219-249.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is: Small Rumin. Res.

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added. In the case of Latin alphabets other than English (French, German, Spanish, etc.) an English translation should be given between parentheses after the original title.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

Formulae

1. Formulae should be typewritten, if possible. Leave ample space around the formulae.

2. Subscripts and superscripts should be clear.

3. Greek letters and other non-Latin or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter i.

4. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

5. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

6. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

7. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp.

8. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

9. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

10. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

11. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it will be possible to incorporate the information in normal text.

2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

1. Authors, when quoting from someone else's work or when considering reproducing an illustration or table from a book or journal article, should make sure that they are not

infringing a copyright.

2. Although in general authors may quote from other published works, they should obtain permission from the holder of the copyright if they wish to make substantial extracts or to reproduce tables, plates, or other illustrations. If the copyright-holder is not the author of the quoted or reproduced material, it is recommended that the permission of the author should also be sought.

3. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected, and must not be published unless permission has been obtained.

4. A suitable acknowledgement of any borrowed material must always be made.

Proofs

One set of proofs will be sent by e-mail to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed.

Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. **Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication.** Subsequent corrections will not be possible, so please ensure that your first sending is complete.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Author Gateway from Elsevier. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently-asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

1. Fifty offprints will be supplied free of charge (100 for Review Articles).

2. Additional offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.

3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra offprints.

Author Services

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature of Elsevier's Author Gateway.

Small Ruminant Research has no page charges.

print page

close window

author GATEWAY

[Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Contact Us](#)

© 2004 Elsevier L

[BOOKS](#)
[JOURNALS](#)
[WEBSITES](#)
[E-MAIL ALERTS](#)
[SEARCH](#)
[SITE INDEX](#)
[SUBJECT INDEX](#)
[Shopping Cart](#)
[View Cart](#)
[Journals](#)
[Subscribe/Renew](#)
[Aims & Scope](#)
[Editorial Information](#)
[Table of Contents](#)
[Author Guidelines](#)
[Permissions](#)
[Advertising](#)
[List of all Journals](#)
[Online Information](#)
[Service Providers](#)
[Customer Services](#)


Journal of Veterinary Medicine Series B

Infectious Diseases and Veterinary Public Health

Edited by:

Andreas Hensel, Uwe Truyen, and
Max Wittenbrink

Print ISSN: 0931-1793

Online ISSN: 1439-0450

Frequency: Monthly

Current Volume: 51

ISI Journal Citation Reports®

Ranking: 2003: 54/129 (Veterinary
Sciences)

Impact Factor: 0.656



Online access

Access this journal [online](#).

**Blackwell
Synergy** 

Author Guidelines

Downloads: [Copyright Assignment Form](#);
[Colour Work Agreement Form](#)

1. GENERAL

The *Journal of Veterinary Medicine B* publishes original experimental papers and also short communications of important new research results intended for speedy publication. Review articles written by specialists who are in a position - because of their own long-standing experiences in research - to write critically and comprehensibly about the current status of their speciality, are also published. Review articles should not only quote the most recent publications on the particular subject, but should evaluate them in comparison with the writer's own experiences. Apart from presenting the problem, the review article should also provide suggestions for further research, as well as potential application of such research. Authors for review articles will be invited by the Editor-in-Chief.

The main objective of the Journal is to present results of basic research as well as applied research. The subject scope encompasses contributions on infectious diseases, bacteriology, mycology, virology, parasitology, immunobiology, animal hygiene, food hygiene, epidemiology (public health). Infective organisms dealt with are: viruses, bacteria, fungi and parasites. Special emphasis is placed on links between veterinary medicine and the associated sciences of human medicine, biology and agriculture.

The publication language is English.

2. SUBMISSION AND ACCEPTANCE OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be sent to the Technical Editor:

Dr. Petra Hensel
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
An den Tierkliniken 1
04103 Leipzig, Germany

Please submit your manuscript on diskette, zip, or CD-ROM with three hardcopies and retain a copy for yourself. When sending slides please include two additional prints of each slide. Manuscripts must conform to the journal style and should be submitted in the final version containing all revisions. Upon acceptance of your manuscript, you will receive a [Copyright Assignment Form](#) to be returned to the Editor-in-Chief within five days. This form includes, among other items, your complete correspondence address, the copyright transfer agreement, and the guidelines for colour print charges.

The reviewers evaluate the papers, and the Editor-in-Chief decides on acceptance, changes, or rejection. No changes will be made without the approval of the author.

Your manuscript will be destroyed three months after publication. Only appropriately marked originals will be returned. The publisher cannot be held responsible for any damage or loss through the post.

3. REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS

3.1. Format

Three copies of manuscripts should be submitted together with a diskette. The manuscript must be typewritten on one side of DIN A4 paper (21 × 29.7 cm or 8.5 × 11"), with a left-side margin of 4 cm and double-spaced lines. Preferably, lines should be numbered, starting each first line on every new page with 1.

On page one of the manuscript the name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the manuscript, the names of the authors, the addresses of the authors, the e-mail address of the corresponding author and the number of figures and tables of the manuscript must be given. Each original article should be divided into Summary, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References. Summaries should not be longer than 20 lines, each about 60 letters, for original papers, or 10 lines at 60 letters each for Short Communications. Results should be presented either in a table or a figure, not both.

The manuscript comprises a printout of the text and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Any corrections requested by the reviewer should already be integrated into the file.

The data carriers (diskette, etc.) must be PC/Windows-compatible and may not contain any files other than those for the current manuscript. Please include a list of the files, noting the file name, the computer program and its version number. Please do not import the figures

into the text file. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word, Word Perfect) or saved in rtf format; do not use automated or manual hyphenation. Please do not include footnotes.

For further information please consult:

<http://www.blackwellpublishing.com/authors/journal.asp>.

3.2. Length

Original papers should not exceed 20 typewritten pages, including illustrations, tables and references. Short Communications should not exceed 5 typewritten pages, including figures, tables and references. Short Communications may be published more rapidly. Review articles - including illustrations, tables and literature references - should not exceed 40 typewritten pages (format DIN A4 or 8.5 × 11"). The number of illustrations and tables must be kept to a minimum.

3.3. Units, Abbreviations and Nomenclature

All specifications must be stated according to the S.I. system. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight).

Any abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical or other terms should be used according to the most recent recommendations of the respective international nomenclature. Enzymes should be given in I.U. (International Units), according to *Enzyme Nomenclature* (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, when they are first mentioned in the text, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®.

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

Names of micro-organisms and zoological names will be printed in italics and should be underlined in the manuscript.

3.4. Illustrations and Tables

Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Photographs or drawings submitted for publication with the manuscript must be of high quality, distinct and well-focused, if they are to be suitable for reproduction. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Figures printed in colour are subject to an added

charge. Colour print charges are explained on the [Colour Work Agreement Form](#). Colour graphics should be created using the CMYK colour palette (print colours), not RGB (monitor colours). There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher.

Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper. Printouts should be made with a laserprinter at the highest resolution (≥ 600 dpi). If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Tables should be created using the table function.

In the case of figures or tables taken from already published material, their source must be stated, and copyright waivers must be obtained.

3.5. References

Each original paper should include bibliographical references which should be restricted to the necessary minimum. The name of the journal in which the paper cited appears should be listed in the form of the abbreviated title from the cover of the journal concerned, otherwise use the abbreviations contained in a *Bibliographic Guide for Editors & Authors* from Chemical Abstracts, which is available in all major libraries, or the *World List of Scientific Periodicals*, 4th ed., London 1963-65. Anonymous contributions should be placed at the beginning of the list of references. The list of references should be in alphabetical order of first authors' names.

Each reference should contain the following data:

First author's surname in capital letters followed by the initials of given names and other authors with initials preceding the surname, year of publication (no brackets), title of the paper, abbreviated title of journal, volume number - in bold - and page numbers, e.g.

Gothe, R., Y. Gold, and A. Kraiss, 1986: On the subspecific validity of *Rhipicephalus mimeticus* Dönitz, 1910. J. Vet. Med. B 33, 47-59.

Books or other separate publications should be quoted as follows:

Author(s) with surname in capital letters, initials of given name(s), year of publication (no brackets), book title, publisher, publishing place, e. g.: Bisping, W., and G. Amtsberg, 1988: Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin.

References in the text to literature in the References

should be given by placing in parenthesis the name(s) of the author(s), adding the year of publication (e.g.: Thein and Härtl, 1986).

3.6. Laboratory Animals

In the case of a research project in which experimental animals were involved the authors are requested to give precise details about the animals in the interest of reproducibility of the findings (e.g. source, breeding, pathogen-free, conventional, weight) and their maintenance (standard diet, environment etc.). In addition, it is necessary to document that all procedures with animals were carried out in accordance to appropriate humane methods.

4. COPYRIGHT

Publication in the journal can only take place under the condition, that the manuscript has not been published or submitted for publication elsewhere. Upon submission of the manuscript to the publisher, the author certifies that neither his contribution nor any foreign text or figures contained therein that he procures infringe upon the rights of a third party, and that he alone is authorized to dispose of the existing right of utilization with regard to copyright. The author will refrain from any other duplication and distribution or digital transfer and reproduction (e.g. on the Internet) during the period of the contract. For the duration of the lawful copyright, the author grants the publisher regardless of location the exclusive right of duplication and dissemination (right of publication) without restriction as to the intangible reproduction of the article, the right to make the article available to any individual online as well as the right of issuance of licenses to third parties nationally and abroad for the exercise of the granted ancillary rights. The publisher is authorized to make use of the utilization rights to which he is entitled; however, he is not obligated to do so.

5. PROOF CORRECTION AND OFFPRINTS

When you receive proofs of your article, please check, sign and return them without delay. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site:

www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html.

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Instead of an honorarium the author will receive 25 free offprints. Additional offprints can be ordered on the form attached to the proofs. Orders placed at a later date are subject to a higher charge. Offprints and complimentary copies will be sent to the corresponding or first-named author for distribution, unless otherwise noted on the

order form.

last update: January 04

Top 

INSTRUCTIONS FOR JAVMA AUTHORS

| [AVMA Home](#) | [AVMA Journals Home](#) | [Instructions for JAVMA Authors](#) | [JAVMA online](#) |

The mission of the *Journal of the American Veterinary Medical Association* is to promote the science and art of veterinary medicine and to provide a forum for discussion and dissemination of ideas important to the profession.

- [Instructions for Online Manuscript Submission](#)
- [Keywords for Authors and Reviewers](#)
- [Copyright Transfer Agreement](#)
- [Statement on Prior Publication, Concurrent Submission, Authorship, and Funding](#) (PDF)
- [AVMA Manuscript Central](#)

Editorial policies

The *Journal of the American Veterinary Medical Association* is a peer-reviewed general veterinary medical journal that publishes manuscripts dealing with any subject germane to the practice of veterinary medicine. For scientific manuscripts, preference will be accorded to those that have clinical or practical value.

Authors who submit manuscripts to the journal should carefully read these Instructions for Authors when preparing their manuscripts, because compliance with these instructions will help reduce delays in manuscript processing. Authors submitting manuscripts for publication in specific features of the journal should read recent issues of the journal for examples of how such reports and features are typically organized. Authors who have additional questions are encouraged to consult with an AVMA editor prior to manuscript submission.

A manuscript is received with the understanding that it and all revisions have been approved by each author and that neither the manuscript nor any of its parts, except in abstract form, has been published or is under concurrent consideration by any other publication. The corresponding author must provide a signed statement to this effect.

An author who plans to submit a manuscript containing information published in any compiled printed (eg, journals, symposia, proceedings, newsletters, books) or electronic (eg, Web sites, CD-ROMs) format should consult an AVMA editor prior to submission to ensure that the manuscript will not be rejected because of prior or simultaneous release of similar information (see editorial, *J Am Vet Med Assoc* 1998;213:1091-1092). Publication of abstracts of 250 or fewer words does not constitute prior publication; however, publication of longer abstracts may preclude publication of the manuscript.

Readers who submit letters to the editor must limit them to 500 words (longer letters will be

condensed as needed) and 6 references. All letters are subject to editing.

The *Journal of the American Veterinary Medical Association* is covered by copyright. All authors will be required to sign a written statement transferring copyright to the AVMA prior to publication of any manuscript or letter. Requests to copy, reprint, or use portions of published material (including information in figures and tables) should be addressed to the editor-in-chief.

Manuscript submission

Manuscripts should be submitted online at <http://avma.manuscriptcentral.com>. Manuscripts may also be submitted by conventional mail, but online submission is recommended to expedite processing of manuscripts.

Online manuscript submission — For online submission, manuscripts must be in Microsoft Word format (.doc) or rich text format (.rtf). The manuscript (including footnotes, references, figure legends, and tables) must be double-space typed, using 12-point Times New Roman font, 1-inch margins, and left justification. Manuscripts should be arranged as follows: title page, structured abstract (when applicable), Interpretive Summary (when applicable), text, footnotes, references, figure legends, and tables. The title page must include the title and the first name, middle initial, and last name of each author, along with each author's professional degree, highest earned academic degree, and diplomate status (for authors who are diplomates of AVMA-recognized specialty organizations). Professional affiliations of the authors at the time of the study should be indicated. If an author's affiliation has changed since the study was performed, the author's new affiliation should be identified. If information in the text has been presented at a scientific meeting, this should be indicated on the title page. Acknowledgments, sources of funding, and the name of the corresponding author should also be included on the title page. Software programs that automatically create endnotes, footnotes, and references should not be used. Each line and page of the manuscript must be numbered.

Tables should be included at the end of the manuscript in the same electronic file; however, if necessary, they can be saved as separate files.

All figures should be saved as separate electronic files; figures should not be embedded in the manuscript. Simple figures such as line drawings, bar graphs, and line graphs prepared in Excel should be saved as Excel files (.xls). Line drawings and graphs that were not prepared in Excel should be scanned on a flatbed scanner. Files should be saved as .TIF files; however, .JPG, .GIF, .EPS, and .BMP files are also acceptable. Figures created with software programs that use proprietary graphic formats (eg, SigmaPlot, Statistix) cannot be used; most such software programs have the capability to save figures in one of the aforementioned formats. Minimum resolution for line drawings and charts is 1,000 dots per inch.

Figures that consist of images (eg, photographs, photomicrographs, and radiographs) should be scanned on a flatbed scanner at a resolution of at least 300 dots per inch. Files should be saved as .TIF files; however, .JPG, .GIF, .EPS, and .BMP files are also acceptable. If images were obtained with a digital camera, please submit the electronic file, rather than printing out the image and scanning it.

Once electronic files of the manuscript and all of its parts have been prepared, log on to AVMA Manuscript Central at <http://avma.manuscriptcentral.com>. If you already have an account with the system, login with your user id and password, click on "Author Center," and select "Submit First Draft of a New Manuscript." Follow the instructions for submitting your manuscript. After submitting your manuscript, please check that your User Information (including mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address) is current. If you do not have an account with the system, click on "create a new account." Fill in all fields carefully; all fields in bold are required.

The corresponding author is also responsible for submitting required supplementary materials, including a completed [Copyright Transfer Agreement](#) signed by all authors; a copy of the [Statement on Prior Publication, Concurrent Submission, Authorship, and Funding](#) (PDF) signed by the corresponding author; copies of any references listed as "in press" or "submitted"; a copy

of any abstracts containing information from the manuscript that have been published or submitted for publication; and a copy of the signed permission form from the copyright holder if the manuscript contains any tables or illustrations that have been published previously. This supplementary material may be submitted electronically (eg, by scanning and uploading with the manuscript or by uploading the electronic file) or by fax.

During submission of your manuscript, you will be requested to supply up to 5 keywords for the manuscript. Lists of the [keywords](#) that can be used are available on the AVMA Web site.

Conventional paper submission — Manuscripts should be prepared as described for online submission and mailed to JAVMA, American Veterinary Medical Association, 1931 N Meacham Rd, Suite 100, Schaumburg, IL 60173-4360. Three hard copies of the manuscript and three high-quality hard copies of each figure must be submitted, along with electronic copies of the manuscript and figures on a 3.5-in PC-formatted disk. Electronic files should be saved as Microsoft Word (version 6.0 or higher) documents; electronic figures should be prepared as described for online manuscript submission.

Manuscripts must be accompanied by a cover letter from the corresponding author that includes his or her mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address. Corresponding authors are also responsible for submitting required supplementary material, including a completed Copyright Transfer Agreement signed by all authors; a copy of the Statement on Prior Publication, Concurrent Submission, Authorship, and Funding signed by the corresponding author; three hard copies of any reference listed as "in press" or "submitted"; copies of any abstracts containing information from the manuscript that have been published or submitted for publication; and written permission from the copyright holder if the manuscript contains any tables or illustrations that have been published previously.

Authorship

At least one author of a manuscript dealing with clinical interpretations or treatments must be a veterinarian. In the instance of multiple authorship, each author must have generated part of the intellectual content of the manuscript and must agree with all interpretations and conclusions. For multi-institutional studies, the individual who headed the study should be listed as an author, along with individuals who provided assistance with pathologic studies (eg, review of gross and histologic specimens) and statistical analyses and any other individual who had a substantial impact on the study design or made a unique contribution to the study. Individuals who submitted case material should be listed as authors only if they contributed at least 10% of the cases included in the study; individuals who contributed less than 10% of the cases should be listed in the acknowledgments. Requests to list a study group in the byline will be handled on a case-by-case basis.

Funding

Authors are expected to acknowledge all sources of funding or financial support and to disclose to the editor any financial interests (including ownership, employment, consultancy arrangements, and service as an officer or board member) they have with companies that manufacture products that are the subject of their research or with companies that manufacture competing products.

Humane animal care and use

A manuscript suggesting that animals have been subjected to adverse, stressful, or harsh conditions or treatments will not be processed for publication unless the authors demonstrate convincingly that the knowledge gained was of sufficient value to justify these conditions or treatments. Investigations involving research animals must comply with the *Animal Welfare Act*, *US Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals*, *NRC Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching* (Fass 1999), or equivalent guidelines. Manuscripts describing prospective studies involving client-owned animals should include documentation of informed client consent.

Style

For questions of style, refer to the latest edition of the *American Medical Association Manual of Style*. For anatomic terms, use anglicized versions of official terms listed in the *Nomina Anatomica Veterinaria*. Refer to the latest editions of the *American Drug Index* and *USP Dictionary of USAN and International Drug Names* for proper spelling of chemical and drug names and to the latest edition of *Dorland's Illustrated Medical Dictionary* for proper spelling and use of medical terms. Refer to *Bergey's Manual of Determinative Microbiology* for spelling and correct taxonomic classifications of microorganisms.

Use of abbreviations should be kept to a minimum, and abbreviations should not be used to begin a sentence. An abbreviation must be derived from the word or words immediately preceding it and must be spelled out the first time it appears. Except for the abbreviations ELISA, ACTH, EDTA, DNA, and RNA, abbreviations should not be used in titles. The following commonly recognized abbreviations may be used in the text, figures, and tables without first being spelled out: ACTH, ADP, AMDUCA, ANCOVA, ANOVA, ATP, ATPase, AVMA, BCG, BUN, cAMP, CBC, CNS, CPR, CSF, DNA, ECG, EDTA, ELISA, FDA, FeLV, FIV, H&E, Hct, HEPES, hpf, PAGE, PCV, RBC, RNA, SD, SDS, SE, SEM, USDA, and WBC.

Products, equipment, and drugs should be identified by chemical or generic names or descriptions. A trade name may be included in a lettered footnote if that specific product, equipment, or drug was essential for the outcome. If the study or manuscript involved evaluation of efficacy or safety of a pharmaceutical, biologic, or other product, this product must be commercially and legally available in the United States.

Body weights and temperatures must be reported in metric and traditional US (lb, °F) units. Dosages must be given on a mg/kg and mg/lb of body weight basis. All dosages must include route of administration and interval (eg, 10 mg/kg [4.5 mg/lb], IV, q 12 h).

Categories of manuscripts

Authors may submit manuscripts for publication in the following sections: *Views*, *Veterinary Medicine Today*, and *Scientific Reports*. The *Views* section is a forum for exchange of ideas and includes features such as Letters to the Editor and Commentaries. The *Veterinary Medicine Today* section promotes continuing education through didactic exercises, case discussions, and updates on clinical topics and includes features such as **ECG of the Month**, **Theriogenology Question of the Month**, **Timely Topics in Nutrition**, **Topics in Drug Therapy**, **What Is Your Diagnosis?**, and **Zoonosis Update**. Not every feature is published in an issue. Authors who wish to contribute a manuscript to the What Is Your Diagnosis? or Diagnostic Imaging in Veterinary Dental Practice feature should consult the instructions for those features.

- [What Is Your Diagnosis?](#) Instructions for Authors
- [Diagnostic Imaging in Veterinary Dental Practice](#) Instructions for Authors

Authors who wish to contribute a manuscript to another feature should refer to a recent issue of the JAVMA that contains that feature for information.

The *Scientific Reports* section contains articles on important original research, clinical cases, and concise reviews. Types of manuscripts published in this section include Original Study, Retrospective Study, Descriptive Report, Clinical Report, and review articles. A manuscript based on original research in which animals had a naturally developing or experimentally induced disease or condition will be considered for publication as an **Original Study**. A manuscript based on evaluation of case records accumulated during a specific period will be considered as a **Retrospective Study**. A manuscript in which a new surgical technique, treatment, or diagnostic method is described will be considered as a **Descriptive Report**. A manuscript dealing with any number of clinical cases will be considered as a **Clinical Report**. **Reference Point** articles are concise reviews concerning subject areas in which important advances have been made during the past 5 years and contain information that has, or will have, clinical application.

Manuscript preparation

With the exception of review articles, all manuscripts submitted to the Scientific Reports section

must include an **Interpretive Summary** of 150 or fewer words that is a synopsis of principal findings and clinical relevance. All Original Study and Retrospective Study manuscripts must also include a **Structured Abstract** of 250 or fewer words, organized under the following headings: Objective, Design, Animals or Sample Population, Procedure, Results, and Conclusions and Clinical Relevance. Clinical Report manuscripts must include 2 to 4 bulleted statements at the beginning of the manuscript that are generalizations about the condition described.

The text for an **Original Study** is organized under the following headings: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. The **Introduction** should supply sufficient pertinent background information to allow readers to understand and interpret results. It must include the rationale for the study, the investigators' hypothesis, and a clear statement of the purpose of the study. The **Materials and Methods** section should describe the experimental design in sufficient detail to allow others to reproduce the study. A subsection detailing statistical methods used to summarize data and test hypotheses and the level of significance used for hypothesis testing should be provided. When citing software products, use a footnote to cite software (eg, PROC GLM, SAS Institute, Cary, NC) and a reference to cite a *User's Guide* (eg, *SAS user's guide: statistics, version 5 edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc, 1985;page number). The **Results** section should provide data that are clearly and simply stated without discussion or conclusions. Tables and figures should be cited parenthetically. Authors of manuscripts reporting gene sequences should submit those sequences to an appropriate data bank. The **Discussion** section should focus on findings in the manuscript and should be brief, containing only discussion that is necessary for interpretation of findings. The Discussion should concentrate on what is known in animals, not what is known in humans.

A **Retrospective Study** is organized in a manner similar to that of an Original Study with the exception that the Materials and Methods section is replaced with Criteria for Selection of Cases and Procedures sections. A Retrospective Study must include a meaningful statement of purpose, clinically relevant data, and clinically useful conclusions or interpretations derived directly from evaluation of the cases described. Except for rare conditions, Retrospective Studies should contain information on at least 10 animals and include appropriate statistical analyses.

A **Descriptive Report** is organized in a manner similar to that of an Original Study. The Introduction section is limited to 1 or 2 short paragraphs. The Material and Methods section is replaced with a Procedures or Techniques section, in which a description of the procedure or technique is provided. The Results section contains the number and description of the animals, outcome, and complications and is followed by the Discussion section. A Descriptive Report does not typically contain statistical analyses.

A **Clinical Report** begins with the signalment of the animal or animals, followed by a chronologic description of pertinent aspects of the diagnostic examination, treatment, and outcome, and ends with a brief discussion. When more than one animal is involved, a representative of the group should be described in detail; important differences among animals can be addressed separately. For reports in which there are 3 or fewer animals, summarize pertinent abnormal findings in the text. For 4 or more animals, one table that provides a summary of pertinent abnormal findings may be accommodated, provided that such findings are not repeated in the text.

Footnotes

Cite footnotes by superscript, lowercase letters in the order in which they appear in the text. List footnotes alphabetically by superscript letter just before the references. For products and equipment, provide complete information in the footnote, including manufacturer's name and location (ie, city, state, and country [if other than the United States]). Abstracts, personal communications, and theses should be cited as footnotes.

References

Authors bear primary responsibility for accuracy of all references. References must be limited to those that are necessary and must be cited in the text by superscript numbers in order of citation. Journal titles in the Reference section should be abbreviated in accordance with the National Library of Medicine and *Index Medicus*. For references with more than 3 authors, only the first 3

authors should be listed, followed by "et al." The following is the style used for common types of references:

Article in journal

1. Lamont LA, Bulmer BJ, Sisson DD, et al. Doppler echocardiographic effects of medetomidine on dynamic left ventricular outflow tract obstruction in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002;221:1276-1281.

Book chapter

2. Muir P, Johnson KA, Manley PA. Fractures of the pelvis. In: Birchard SJ, Sherding RG, eds. *Saunders manual of small animal practice*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 2000;1126-1132.

Proceedings

3. Moore MP, Bagley RS, Harrington ML, et al. Intracranial tumors, in *Proceedings*. 14th Annu Meet Vet Med Forum 1996;331-334.

Electronic material

4. Animal and Plant Health Inspection Service Web site. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). Available at: www.aphis.usda.gov/lpa/issues/bse/bse.html. Accessed Feb 18, 2003.

Figures

Limit figures to those that reduce or clarify the text. Text and symbols should be large enough that they will still be legible when the figure is reduced to one column width during publication. To ensure high-quality reproduction, symbols used in graphs should be limited to open and closed circles, triangles, and squares; axes should be labeled in Helvetica or Arial font. Keys to symbols may be placed in a small box inserted into the unused portion of graphs. Photomicrographs and electron micrographs must have an internal scale marker. To express magnification with an internal scale marker, divide the length of the marker by the original magnification. For figures that consist of multiple parts, individual parts of the figure should be identified by capital letters embedded in the figure, rather than by describing the location of the part in the legend (eg, top right).

For preparation of electronic copies of figures, please see the section on online manuscript submission. Hard copies of figures that are submitted must be identified on the back along the top margin with the first author's name, the figure number, and an arrow (or "top") indicating the top of the figure, taking care not to write in the area of interest. Radiographs and transparency slides will not be accepted for review or publication.

Figure legends must be given at the end of the manuscript. Sufficient information should be included to allow the figure to be understood without reference to the text. When applicable, stains used for histologic sections should be indicated in the legend. Authors wishing to use any previously published figures must submit written permission from the copyright holder.

Tables

Submission of excessive tabular data is discouraged, and tables should be limited to those containing data important to understanding and interpreting results of the study. Authors will be asked to delete tables containing data that could be given more succinctly in the text. Do not use tables that focus on findings in individual animals. Authors wishing to use any previously published tables must submit written permission from the copyright holder.

Peer-review process

The JAVMA reserves the right to reject any manuscript. Manuscripts submitted to the *Scientific Reports* section are subject to peer review, as are didactic exercises, case discussions, reviews of clinical topics, and features sponsored by specialty colleges or academies submitted to the *Veterinary Medicine Today* section. Manuscripts submitted to the *Scientific Reports* section are reviewed initially by an AVMA scientific editor. Those with insufficient priority for publication are

rejected promptly. Manuscripts considered for publication are sent to a minimum of 2 experts for external peer review. [Instructions provided for external reviewers](#) are available on the AVMA Web site for authors' perusal. Identity of peer reviewers is kept confidential; identity of authors is not.

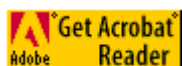
Authors are expected to respond to reviewer comments and make appropriate revisions within 30 days. Revised manuscripts may be rereviewed. Manuscripts that pass peer review are accepted for publication provided that authors respond meaningfully to questions and concerns raised by an AVMA scientific editor. For manuscripts that are rejected, hard copies of the text and accompanying materials will not be returned to the authors unless requested in writing by the corresponding author.

Sequence of publication

The JAVMA is published twice a month. Manuscripts are processed for publication in the order that they pass peer review, except that manuscripts dealing with emerging or zoonotic diseases or biodefense are prepared for publication as soon as they pass peer review. Adherence to these instructions and expedient revision and return of manuscripts will minimize time from submission to publication.

Version: January 1, 2004

[| AVMA Home](#) | [AVMA Journals Home](#) | [Instructions for JAVMA Authors](#) | [JAVMA online](#) |



Some files on this page require Adobe Acrobat Reader software. Click on the image at left to download it for free from the Adobe site.

[AVMA Home](#) | [Privacy Notice](#) | [About the AVMA](#)

[AVMA Journals](#) | [JAVMA News](#) | [Discussion Groups](#) | [Professional Resources](#)

American Veterinary Medical Association
[Copyright © 2004](#)



Universidade Federal de Pernambuco

CÉLULAS DE MEMBRANA SINOVIAL CAPRINA PARA PESQUISA DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (LVPR)

CALLADO, A. K. C.¹; CASTRO, R. S.²; NASCIMENTO, S. A.²; COSTA, L. S. P.²; OLIVEIRA, M. M. M.²; ALENCAR, C. A. S.³; BENEVIDES, R. G.²; LIMA, V. L. M.¹

¹Universidade federal de Pernambuco-Curso de Doutorado em Ciências Biológicas.; ²Universidade Federal Rural de Pernambuco-Depto. de Medicina Veterinária.; ³Laboratório de Apoio Animal do Ministério da Agricultura.

INTRODUÇÃO

Os pequenos ruminantes podem ser infectados por um grupo de lentivírus, genericamente denominados de Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), que compreende vários isolados distribuídos, basicamente, em dois grupos filogenéticos, cujos protótipos são os vírus Maedi-Visna (MVV) e Artrite-encefalite Caprina (CAEV), que causam doenças degenerativas progressivas lentas, determinando importantes perdas econômicas (Castro et al. 1999).

As culturas celulares são rotineiramente utilizadas na biotecnologia para, dentre outras coisas, produção de proteínas para diagnóstico. O cultivo primário de células da membrana sinovial é amplamente utilizado para isolamento, identificação, propagação, titulação e detecção de anticorpos neutralizantes de LVPR. Entretanto, estas células apresentam limitada capacidade de divisão em cultura e após aproximadamente 25 passagens atingem estado de senescência celular ou de não-proliferação. Este trabalho teve como objetivo a otimização da produção celular.

MATERIAL E MÉTODOS

As células de membrana sinovial (MS) foram obtidas de fetos caprinos soronegativos para LVPR (ABREU et al., 1998; CALLADO et al., 1999). As culturas de explantes foram estabelecidas como segue: articulações intercarpais de ambos os membros foram assepticamente abertas e a membrana sinovial obtida com mínimo tecido periarticular, através de dissecação cuidadosa. As membranas foram umedecidas com Meio Essencial Mínimo [MEM-Eagle com penicilina, estreptomicina e anfotericina B], acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB), seccionadas em fragmentos de 0,5 a 1,0 mm de diâmetro e colocados em garrafas de cultivo de 25 cm², incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após aproximadamente 30 minutos, foi adicionado 2,0 ml de MEM, suficientes para cobrir os explantes. Passados cinco dias, quando foram evidenciados adesão e crescimento celular, os fragmentos foram removidos e transferidos para outra garrafa. A remoção dos e a transferência dos explantes foi realizada por seis vezes. As células foram rotineiramente subcultivadas após tripsinizações (associação tripsina a 0,2% e ácido etileno diamino tetracético a 0,02%), com intervalo de sete dias, na proporção de 1:3 e mantidas em MEM acrescido de 10% de SFB.

A sensibilidade das células da membrana sinovial à infecção por lentivírus foi estabelecida utilizando 4 amostras de LVPR: CAEV Cork (CORK et al., 1974), Maedi-Visna K1514 (SIGURDSSON et al., 1960), BrPe1-01 e BrMg2-03 (CASTRO et al., 1999). As monocamadas de MSC subconfluentes foram inicialmente infectadas com 1ml (por garrafa de 75 cm²) da suspensão original, estocada em N₂ líquido, diluída 1:5. Após 1 hora a 37°C o inoculo foi removido e substituído por 25 ml de MEM contendo 2% de SFB. As células foram avaliadas diariamente para observação do aparecimento de sincício durante 30 dias, após o qual as garrafas foram coradas para avaliação qualitativa, com base no efeito citopático, da replicação viral.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A obtenção de monocamadas de células a partir do aproveitamento dos explantes de MS dos corpos de fetos caprinos forneceu 8 garrafas de cultura celular de 25 cm² de área de cultivo por feto. A metodologia rotineiramente utilizada no nosso laboratório permitia a obtenção de apenas 2 garrafas de cultura celular de 25 cm² de área de cultivo por feto pois após o estabelecimento da nova monocamada os fragmentos eram removidos e descartados. O melhor rendimento da metodologia com o aproveitamento dos explantes é de significativa importância considerando-se as dificuldades na obtenção de fetos no matadouro, no processamento, na manutenção e no congelamento de células primárias além dos riscos da introdução de agentes infecciosos na manipulação de material proveniente de matadouro.

Sabe-se que células em alta passagem podem reduzir a eficiência na replicação viral. O desejável é a utilização das células em baixa passagem para a produção de partículas virais. Os explantes foram removidos e transferidos para outra garrafa por seis vezes, obtendo-se, desta forma, células primárias em diferentes passagens no mesmo intervalo de tempo, possibilitando a sua utilização para replicação viral ainda nas primeiras passagens.

Um fator limitante para o melhor rendimento da produção celular através do aproveitamento dos explantes foi o tamanho dos fragmentos. Os fragmentos menores foram perdidos durante a remoção e transferências sucessivas.

As células foram rotineiramente subcultivadas após tripsinizações e mantiveram-se em níveis satisfatórios de vitalidade, produtividade e permissividade à replicação das amostras padrão de LVPR por mais de 25 subcultivos, como previamente observado (ABREU et al., 1998; CALLADO et al., 1999). Figura 1.

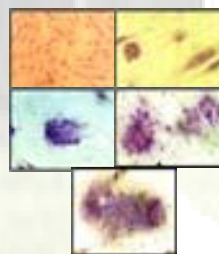


Figura 1: Efeito citopático de lentivírus de pequenos ruminantes em células de membrana sinovial caprina coradas pelo corante de Giemsa (100x). A. Monocamada não infectada. B. Início da formação de sincício pela amostra BrPe1-01. C. Sincício causado pela amostra BrMg2-03. D. Sincício causado pela amostra CAEV Cork. E. Sincício causado pela amostra Maedi-Visna K1514.

CONCLUSÕES

O aproveitamento dos explantes de MS dos corpos de fetos caprinos forneceu rendimento maior de garrafas de cultura celular por feto caprino, possibilitando a utilização, para replicação viral, de células nas primeiras passagens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S. R. O., CASTRO, R. S., NASCIMENTO, S. A., SOUZA, M. G. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar-gel. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 18 (2), p. 57-60, 1998.
- CALLADO, A.K.C., CASTRO, R.S., NASCIMENTO, S.A., SILVA-RODRIGUES, M.I.M., PINTO-JÚNIOR, J.H. & TEIXEIRA, M.F.S. Preliminary characterization of the infection of synovial membrane cells by brazilian samples of small ruminants lentiviruses. *Ciência Vet. Trop.* v. 2(3), p. 152-159, 1999.
- CASTRO, R.S., LEITE, R.C., RESENDE, M., MARTINS, A., GOUVEIA, A.M.G. Caprine arthritis encephalitis virus isolation and identification using fluorescent antibody and polymerase chain reaction. *Arq. Bras. Med. Vet.*, v. 51(3), p. 235-240, 1999.
- CORK, L. C., HADLOW, W. J., CRAWFORD, T. B., GORHAM, J. R., PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 129, no 2, p. 134-141, 1974.
- SIGURDSSON, B., THORMAR, H., PÁLSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Arch. Virusforsch.*, v. 10, p. 368-381, 1960.



**XI CONGRESSO
LATINOAMERICANO**



**V CONGRESSO
BRASILEIRO**

**III CONGRESSO
NORDESTINO**

**SALVADOR • BAHIA • BRASIL
02 a 05 de setembro / 2003**

■ COMISSÕES

COMISSÃO ORGANIZADORA

Luciano José Costa Figueiredo (BA)
Presidente da Associação Brasileira de Buiatria e dos Congressos

Ana Elisa Fernandes de Souza Almeida(BA)
Vice-Presidente

Delsique de Macedo Borges (BA)
1º Secretário

Margareth Moura Ferreira (BA)
2ª Secretária

Roberto Viana Menezes
1º Tesoureiro

Plínio Laranjeira de Moura (BA)
Tesoureiro

COMISSÃO DE HONRA

Roberto Rodrigues
Ministro da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Paulo Souto
Governador do Estado da Bahia

Pedro Barbosa de Deus
Secretário da Agricultura do Estado da Bahia

Aroldo Cedraz de Oliveira
Deputado Federal / Bahia

COMISSÃO NACIONAL

Benedito Fortes Arruda (DF)
Cícero Araújo Pitombo (RJ)
Daniel Ollhoff (PR)
Edivaldo A. Nunes Martins (MT)
Emílio Salani (SP)
José Diomedes Barbosa (PA)
José Ferreira Nunes (CE)
José Haldson Coelho Tabosa (AL)
José Renato Junqueira Borges (DF)
Josélio de Andrade Moura (DF)
Mário Luiz Pompeo (MS)
Maurício Garcia (SP)
Patrício Marques de Souza (PB)
Paulo Alex Machado Carneiro (AM)
Raimundo Alves Barreto Júnior (RN)
René Dubois (DF)
Ronaldo Braga Reis (MG)
Severino Vicente da Silva (PI)

COMISSÃO INTERNACIONAL

Albino José Belotto (EUA)
Cláudio Almeida (Argentina)
Eduardo Correia (Brasil)
João Cañas (Portugal)
Maurício Garcia (Brasil)
Recaredo Ugarte (Uruguai)

COMISSÃO CIENTÍFICA

Joselito Nunes Costa (BA)
Presidente

Membros:

Adelmo Ferrelra de Santana (BA)
Agueml Kohayagawa (SP)
Alexandre Secorum Borges (SP)
Ana Paula Cardoso Peixoto (BA)
Armando Pedrelra das Neves (BA)
Carla Lopes de Mendonça (PE)
Edgar Farias (BA)
Eduardo Harry Birgel Júnior (SP)
Eduardo Luiz Trindade Moreira (BA)
Eliomar Perelra do Socorro (BA)
Farouck Zacarias (BA)
Héllo Barbosa Villela Júnior (BA)
Iram da Silva Ferrão (BA)
José Augusto Bastos Afonso (PE)
José Eugênio Guimarães (BA)
José Ferrelra Nunes (CE)
José Jurandir Façliari (SP)
Jurandir Ferrelra da Cruz (BA)
Lulz Hage Rebouças (BA)
Marcos Chalhoub Coelho Lima (BA)
Maria Ângela Ornelas de Almeida (BA)
Marla Consuelo Caribe Ayres (BA)
Maria Helena Silva (BA)
Maria José Moreira Batatinha (BA)
Mauro Pereira Figueiredo (BA)
Paulo Fernando de Almeida (BA)
Sibelle Ferrão (BA)
Sílvia Inês Sardi (BA)
Simone Assis Rosas de Aquino Viegas (BA)
Thereza Concelção Nunes Martinez (BA)
Thereza Cristina Calmon de Bittencourt (BA)

COMISSÃO SÓCIO-CULTURAL

Ellete Maria Barbosa Cerqueira (BA)
Presidente

Membros:

Maria Amélia Tourinho Ribeiro Casu (BA)
Nilzete Clarinda das Virgens (BA)
Marla das Graças Gusmão (BA)





Os papilomavírus são um grupo de vírus de DNA dupla fita. No gado seis tipos de papilomavírus bovino (BPV) são os mais estudados. A infecção por BPV causa: verrugas cutâneas (BPV-1 e BPV-2), papilomatose e câncer do trato gastrointestinal superior (BPV-4), papilomatose de teto e úbere (BPV-1, BPV-5 e BPV-6), pênis (BPV-1) e câncer trato urinário (BPV-1 e BPV-2). Isto torna a papilomatose uma doença de importância sanitária e econômica. As proteínas E1 e E2 são responsáveis pela montagem do capsídeo sendo que, a proteína E1 compõe 90% do capsídeo. Quando expressas em sistemas de expressão eucarióticos, as proteínas E1 são capazes de se organizarem com "virus-like particles" (VLPs). As VLPs são indistinguíveis dos vírus nativos e preservam os epitópos conformacionais necessários à indução de anticorpos neutralizantes. Por não conterem o genoma viral, as VLPs não são infecciosas ou oncogênicas. Representam, portanto, candidatas atrativas para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra o papilomavírus. No Brasil, a papilomatose assume proporções endêmicas sendo de grande importância o seu controle. A produção de uma vacina efetiva contra a papilomatose seria de fundamental neste controle. Neste estudo está sendo avaliada a produção de VLPs contra o papilomavírus bovino tipo 4 (BPV-4) em sistemas de expressão heteróloga. Para tanto, *primers* específicos para o gene E1 do capsídeo viral de BPV-4 foram construídos com base nas sequências depositadas no Gene Bank. Estes *primers* foram utilizados para amplificar por PCR o gene E1, a partir de plasmídeos contendo o genoma viral completo de BPV-4. O produto amplificado foi purificado e clonado vetor pMTL1B4-V5-His6-TOPO (Invitrogen). As construções pMTL1B4 e pMTL1B4V5-His6 foram analisadas quanto à presença e orientação do gene E1 por meio de digestão enzimática. A fase de leitura foi confirmada por sequenciamento. Os resultados obtidos mostram que esta fase foi concluída com sucesso com a obtenção das construções contendo o gene E1 de BPV-4.

108 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA PAPILOMATOSE BOVINA NO BRASIL

Carvalho, C.^{1,2}; Bayer, L.F.³; Freitas, A.C.^{1,2}; Beçak, W.²; Stocco dos Santos, R.C.^{1,2}

1. Laboratório de Genética Instituto Butantan 2. UNIAU 3. EMAP 4. Ministério da Agricultura e-mail: claudemirdece@yahoo.com

A papilomatose bovina que clinicamente consiste no aparecimento de lesões cutâneas verrucosas é uma doença de características endêmicas e de distribuição mundial, já diagnosticada em diversos países. Muito se tem discutido sobre o estabelecimento das infecções e a especificidade desses vírus em relação ao hospedeiro e tecidos infectados. Em bovinos, a forma mais comum de transmissão é a horizontal através do contato direto entre animais portadores de lesões cutâneas características. Essas lesões são geralmente benignas podendo regredir espontaneamente ou se malignizar quando o animal é exposto a fatores ambientais carcinogênicos ou imunossupressores como a quercitina, flavonóide presente no broto da samambaiá (*Pteridium aquilinum* var. *aracnoideum*), comum em solos ácidos. A papilomatose persistente em vacas tem levado à instalação de mamites, além de dificultar a amamentação de bezerros e impossibilitar a ordenha, obrigando o descarte dos animais. O objetivo desse estudo foi avaliar a distribuição geográfica da papilomatose bovina em rebanhos leiteiros do Vale do Paraíba SP, através da inspeção dos animais para verificação de manifestação clínica da doença. Foram observadas lesões cutâneas características espalhadas por todo o corpo do animal, em 2169 propriedades leiteiras investigadas, sendo que em algumas, papilomas cutâneos eram verificados em até 40% dos animais. Esses dados diferem acentuadamente daqueles fornecidos pelos órgãos oficiais, uma vez que a papilomatose não é classificada como doença de notificação obrigatória, ficando a critério do criador ou do médico veterinário a comunicação. O resultado dessa primeira avaliação deu origem a um intenso trabalho de investigação dos tipos virais mais frequentes e das possíveis vias de transmissão do vírus.

109 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA ROTA VIRUS BOVINO

Uta Vale, Q.F.; Gubio, S.C.; Patrícia, B. A.; Silva, I.S.

O Rotavírus (RV), vírus membro da família *Reoviridae*, tem sido identificado mundialmente como o mais importante agente etiológico de diarreias agudas não bacterianas tanto em animais como humanos. As manifestações clínicas da doença não são suficientes para permitir o diagnóstico, já que os sintomas podem ser confundidos com diarreias causada por outros patógenos. Neste caso o diagnóstico requer a detecção do vírus ou de antígenos virais e/ou a demonstração de uma resposta sorológica. Com o propósito de contribuir ao diagnóstico e controle das rotaviruses na nossa região, foram produzidos anticorpos monoclonais (AcM) contra Rotavírus Bovino para seu uso como ferramenta de diagnóstico. Materiais e Métodos: Camundongos Balb/c foram imunizados com a Rotavírus

bovino cepa Nebraska. Os esplenócitos destes animais foram fusionalizados com células de mieloma SP2/0 utilizando Polietilenglicol. As células híbridomas produtoras de anticorpos foram selecionadas e os AcM produzidos foram caracterizados utilizando as técnicas de isotipificação de imunoglobulinas, ELISA, Soroneutralização, Imunofluorescência Indireta (IFI) e Western-Blot. Também foi realizado um teste de ELISA indireto de captura para o uso dos AcM na detecção de antígeno viral nas fezes. Resultados: Foram obtidos um total de 9 clones produtores de AcM contra RV, os quais se comportaram em forma estável e com produção contínua de anticorpos. A isotipificação revelou que dos nove AcM, 8 eram do tipo IgG2a, e somente um (1) era do tipo IgG1. Todos os 9 AcM reagiram positivamente a IFI e ELISA. No teste de Soroneutralização cinco (5) AcM reagiram positivamente mostrando sua capacidade de neutralizar a infectiosidade da partícula viral. Nenhum dos AcM produzidos reagiram positivamente ao Western-blot, o processo de desnaturação das proteínas virais durante a técnica pode ter sido um dos fatores do resultado negativo. No ELISA indireto de captura para detecção de antígeno viral nas fezes, sete (7) AcM mostraram reagir positivamente detectando a presença do vírus em fezes previamente diagnosticadas como positivas segundo testes de referência para detecção de Rotavírus em fezes. Portanto, estes 9 AcM estão sendo analisados para uma melhor caracterização bioquímica, mas os resultados obtidos até o momento mostram eficácia e potencial uso como ferramentas de diagnóstico.

Palavras Chave: Rotavírus bovino, Anticorpos monoclonais, ELISA, Diagnóstico.

110 LEVANTAMENTO SOROLÓGICO PARA CAEV EM CAPRINOS LEITEIROS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Callado, A.K.C.¹; Falcão, L.P.C.A.²; Castro, R.S.³; Oliveira, E.J.C.¹; Falcão Filho, M.C.A.²; Arruda, E.T.³; Nascimento, S.A.²; Campos, K.M.T.²; Melo, L.F.H.²; Menezes, V.L.M.²

As lentiviruses de pequenos ruminantes (LVPR), causadas pelos vírus CAEV e Maedi-Visna, são doenças degenerativas progressivas crônicas que acometem caprinos e ovinos de todas as raças e idades. As LVPR podem se manifestar na forma artrítica, respiratória, mamária e nervosa ou mesmo atingir vários órgãos com perda de peso e debilidade até a morte do animal. Entretanto, a maior parte dos animais permanece toda vida sem desenvolver sintoma da infecção com risco potencial de transmitir o vírus. A principal forma de transmissão do vírus é através da ingestão de colostro e/ou leite proveniente de animais infectados. A identificação dos animais infectados associado ao descarte e/ou separação são os principais meios implementados para prevenir a disseminação da doença. Com o objetivo de conhecer situação epidemiológica das LVPR em caprinos do Estado de Pernambuco, foi feito um levantamento sorológico nos anos de 2002 a 2003. Para isto foram testados todos os animais de 26 rebanhos leiteiros, distribuídos em 4 regiões do Estado de Pernambuco. A detecção de anticorpos foi feita através do teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) utilizando antígeno CAEV Cork produzido na UFRPE. Dos animais testados, 22,99% (109/1344) foram considerados positivos, distribuídos em 76,92% (20/26) dos rebanhos. Dos rebanhos positivos, sete possuíam até 10% de animais positivos, oito entre 10 e 25% e cinco, mais de 25%. Estes dados indicam que as LVPR ainda representam problema sanitário para o rebanho leiteiro do Estado de Pernambuco. Medidas de controle devem ser adotadas para evitar a disseminação da infecção e os possíveis reflexos econômicos para a caprinocultura.

^{1,2} Laboratório de Apolo Animal do MARA - IAPV/RECIFE, Recife, PE. / ³ Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica, Recife-PE. / ⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Medicina Veterinária, Recife-PE. / ⁵ Médico Veterinário.

111 ANTICORPOS CONTRA LENTIVIRUS DE PEQUENOS RUMINANTES (CAEV E MAEDI-VISNA) EM OVINOS SANTA INÊS DO ESTADO DE PERNAMBUCO

Falcão, L.S.P.C.A.; Campos, K.M.T.; Callado, A.K.C.; Castro, R.S.; Oliveira, E.J.C.; Falcão Filho, M.C.A.; Nascimento, S.A.; Melo, L.F.H.; Arruda, E.T.

Os lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) (CAEV e Maedi-Visna) são vírus de grande importância e tem sido motivo de grande preocupação para os vários produtores e pesquisadores onde a caprinocultura é empregada. Eles possuem um difícil controle, entre outras coisas, pelo fato de não existirem vacinas e podem levar a grandes perdas econômicas, devido à sua disseminação lenta e, frequentemente, a não apresentação de sintomas clínicos. No Estado de Pernambuco não é conhecida a frequência de LVPR em ovinos de raças especializadas, mas sabe-se que é elevada em caprinos leiteiros, e baixa em caprinos e ovinos sem raça definida (SRD). Por isto, é importante a condução de um levantamento sorológico para lentiviruses em ovinos de raça pura, como os da Santa Inês, que são animais amplamente utilizados para o melhoramento genético dos



LEVANTAMENTO SOROLÓGICO PARA LVPR EM CAPRINOS DO ESTADO DE PERNAMBUCO



Callado, A. K. C.¹; Castro, R. S.³; Falcão, L. P. C. A.³; Nascimento, S. A.³; Oliveira, E. J. C.³; Falcão Filho, M. C. A.⁴; Melo, L. E. H.³; Lima, V. L. M.²

¹ Laboratório de Apoio Animal do MARA – LAPA/RECIFE. Recife, PE.

² Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Bioquímica. Recife-PE.

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco – Departamento de Medicina Veterinária. Recife-PE.

⁴ Médico Veterinário.

INTRODUÇÃO

As Lentivirose de Pequenos Ruminantes (LVPR) são doenças degenerativas progressivas crônicas que acometem caprinos e ovinos de todas as raças e idades, determinando importantes perdas econômicas (Narayan et al., 1997).

As LVPRs podem se manifestar na forma artrítica, respiratória, mamária e nervosa ou mesmo atingir vários órgãos com perda de peso e debilidade até a morte do animal, causando infecções persistentes com período de incubação longo. Entretanto, a maior parte dos animais permanece toda a sua vida sem desenvolver sintoma da infecção com risco potencial de transmitir o vírus.

A principal forma de transmissão é através da ingestão de colostro e/ou leite proveniente de animais infectados. A infecção também pode ser introduzida por via respiratória (HUSSO et al., 1988).

A identificação dos animais infectados associado ao descarte e/ou separação são os principais meios implementados para prevenir a disseminação da doença (Castro, R. S., 1998).

METODOLOGIA

Com o objetivo de conhecer situação epidemiológica das LVPR em caprinos do Estado de Pernambuco, foi feito um levantamento sorológico nos anos de 2002 a 2003. Para isto foram testados todos os animais de 26 rebanhos leiteiros, distribuídos nas Regiões Agreste (16 rebanhos), Sertão (1 rebanho), Zona da Mata (4 rebanhos) e Metropolitana Sul do Recife (5 rebanhos) do Estado de Pernambuco, nas quais se criavam caprinos da raça Saanen, Anglo Nubiana, Murciana e Parda Alpina.

A detecção de anticorpos foi feita através do teste de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) utilizando antígeno CAEV Cork produzido na UFRPE (Abreu et al., 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Dos animais testados, 22,99% (309/1344) foram considerados positivos, distribuídos em 76,92% (20/26) dos rebanhos. Dos rebanhos positivos, sete possuíam até 10% de animais positivos, oito entre 10 e 25% e cinco, mais de 25%.

Estudos anteriores em rebanhos de caprino leiteiro e SRD de abatedouros no Estado de Pernambuco, foi encontrada uma frequência de animais soropositivos para LVPR de 17,6% (Saraiva Neto et al., 1995) e de, aproximadamente, 3% (Castro et al., 2000; Oliveira, 2002), respectivamente.

A prevalência de animais soropositivos para LVPR em um rebanho depende de fatores relacionados à intensidade de estresse, tipo de nutrição e condições gerais de higiene.

CONCLUSÕES

Estes dados indicam que as LVPR ainda representam problema sanitário para o rebanho leiteiro do Estado de Pernambuco. Medidas de controle devem ser adotadas para evitar a disseminação da infecção e os possíveis reflexos econômicos para a caprinocultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S. R. O., et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da Artrite-Encefalite Caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em ágar gel. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, n. 2, p.57-60, 1998.
- CASTRO, R. S. Lentivírus de pequenos ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas. Universidade Federal de Minas Gerais, 129p. Tese de Doutorado, 1998.
- CASTRO, R. S. et al. Anticorpos contra lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna) em caprinos sem raça definida dos Estados de Pernambuco e Paraíba. In: XXVII Congresso Brasileiro de Veterinária, p. 84. (Resumo)
- HUSSO, L. D. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. *Journal Of Virology*, v. 62: 1974-1980, 1988.
- NARAYAN, O. Et al. Visna-maedi: the prototype lentiviral disease. *Viral pathogenesis*, p. 657-668. Edited by N. Nathanson. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- OLIVEIRA, M. M. M. Anticorpos contra Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos e ovinos sem raça definida em abatedouros nos municípios de São Lourenço da Mata e Paulista do Estado de Pernambuco. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária), 2002.
- SARAIVA NETO, A.O.S., et al. Estudo soroeconômico da artrite-encefalite caprina em Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.15, p.121-124, 1995.