

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DANIELE MASSELLI RODRIGUES

**“INFECÇÃO POR *Cardiovirus* (VÍRUS DA ENCEFALOMIELE
MURINA DE THEILER - TMEV) EM COLÔNIAS CONVENCIONAIS
DE RATOS”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti.

**CAMPINAS, SP
2004**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUNICAMP
	R618
V	EX
TOMBO BC/	59784
PROC.	16-P-117/04
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	14/09/2004
Nº CPD	

Bib id. 321938

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

R618

Rodrigues, Daniele Masselli

Infecção por Cardiovirus (vírus da encefalomielite murina de theiler – TMEV) em colônias convencionais de ratos /

Daniele Masselli Rodrigues. --
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Maria Silvia Viccari Gatti

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Ratos. 2. Infecção. 3. Microbiologia. I. Gatti, Maria Silvia Viccari.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

DANIELE MASSELLI RODRIGUES

**“INFECÇÃO POR *Cardiovirus* (VÍRUS DA ENCEFALOMIELITE
MURINA DE THEILER - TMEV) EM COLÔNIAS CONVENCIONAIS
DE RATOS”**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para a obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Biologia Molecular, na área de
Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti.

**CAMPINAS, SP
2004**

Data da Defesa: 31/03/2004

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra.
Maria Silvia Viccari Gatti**

Assinatura

**Profa. Dra.
Sílvia Maria Gomes Massironi**

Assinatura

**Prof. Dr.
Paulo Maria Ferreira de Araújo**

Assinatura

**Prof. Dr.
Tomomasa Yano**

Assinatura

Aos

Meus pais

Antonio Carlos Rodrigues e Iolanda Maria Masselli Rodrigues

**Pelos exemplos, pelo constante incentivo e por serem tão importantes e especiais em
minha Vida.**

Às minhas irmãs Juliane e Cristiane

Pelo apoio, afeto e confiança.

Ao meu esposo Leandro Demolin

Pelo carinho, pela compreensão, paciência e incentivo nesta grande caminhada.

A todos que estiveram ao meu lado, dedico este trabalho.

“...Ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância, usar as perdas para refinar a paciência, usar as falhas para esculpir a serenidade, usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência...”

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e pela sua proteção.

À Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, pela amizade, orientação do trabalho, pelo apoio, pelos valiosos ensinamentos e pelo desafio em me aceitar nesta caminhada.

Ao amigo Rovilson Gilioli, pela amizade, pelo apoio, pelo estímulo à continuidade deste trabalho e pelo valioso aprendizado na área de animais de laboratório.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, por ser tão especial em minha carreira, pela valiosa amizade, pelo carinho e companheirismo e por ter sido tão importante em minha descoberta da ciência de animais de laboratório.

A todos os professores que participaram da análise prévia, em especial, à Prof. Dra. Sílvia Maria Gomes Massironi, Profa. Dra. Clarice Weis Arns e Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela valiosa contribuição.

À Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada, apesar do curto período de convivência, mas de grande valor pelos ensinamentos, pelo constante incentivo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, pela amizade, pelas valiosas sugestões e por ceder o laboratório para a realização de algumas etapas do trabalho.

À Lenira Aparecida Guaraldo de Andrade, pela amizade, pelo companheirismo e pelas valiosas dicas.

À Márcia Costa Rocha, em especial, pela amizade, pelo constante apoio e por ter me auxiliado em todos os sentidos durante a realização deste trabalho.

À Dirce Lima Gabriel, pela amizade, paciência e por dispensar seu valioso tempo em me acompanhar na utilização da ultracentrífuga.

À Célia Garcia, pela amizade e pelo apoio nos momentos difíceis e de desânimo.

Ao Marcos César, pela amizade e por me auxiliar inúmeras vezes durante a realização deste trabalho.

À Sandra Soares Martins, em especial pela grandiosa amizade, pelo carinho, apoio e dedicação em me ensinar e auxiliar em uma etapa importante deste trabalho.

À Verena Hildegard Gyrfas Wolf, pelo carinho, pela amizade e também por diversas vezes me auxiliar neste trabalho.

À Ana Lúcia Rodrigues da Soledade, pela amizade, pelo carinho e por caminhar junto comigo nesta jornada.

Ao amigo Daniel Roberto Coradi de Freitas, pela amizade e pelo pouco, porém valioso convívio.

Ao Rubens Percini, pelo coleguismo e pela disposição em ajudar em uma etapa fundamental deste trabalho.

À Prof. Dra. Nívea Lopes de Souza, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos amigos do CEMIB/UNICAMP, Luiz Augusto Correa Passos, Delma Pegolo Alves, Armando Ferreira Lima Filho, Sônia Cano Montebelo Rachel, Maria Inês, Marcos Zanfolin e Sílvio Rogério C. dos Santos, pela amizade, colaboração e pelo constante incentivo.

À Equipe da área orçamentária do CEMIB/UNICAMP, Marisa Mendes Mencarelli, Márcio Augusto de Paula, Sérgio Luiz Lucino, Cláudia Aparecida Salvuchi, pela amizade e pela colaboração em atender meus inúmeros pedidos.

À Cristiane Mendes Vinagre, pela amizade e pela colaboração no fornecimento dos animais.

A todos os colegas e funcionários do CEMIB/UNICAMP, dispostos a colaborar em vários sentidos para a realização deste trabalho.

Aos meus sogros, Maria Auxiliadora Denízio Demolin e Reynaldo José Demolin pelo carinho e pelo constante apoio.

A todos os meus tios e tias, em especial à Tia Gracinha, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e pelo infindável apoio.

À Leka, um ser canino, que não poderia faltar, que de uma forma ou de outra foi uma grande companheira na etapa final.

Aos animais que cederam suas vidas para a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Microlitro
BHK	Baby Hamster Kidney
cDNA	DNA complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CO ₂	Gás carbônico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DICT _{50%}	Dose infectante 50% em cultura de tecido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo trifosfato
dpi	Dias após infecção
DTT	ditiotreitól
E.U.A	Estados Unidos da América
ECF	Efeito citopático
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV	Vírus da encefalomiocardite
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFI	Imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IHA	Inibição da hemaglutinação
IRES	Internal ribosome entry site
Kb	Kilobases
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodalton
MEM-Eagle	Meio mínimo essencial de Eagle
mg	miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
ml	Mililitro
mM	Milimolar
M-MuLV	Murine Moloney Leukemia vírus
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro
°C	Grau centígrado
ORF	Open read frame
P.A.	Para análise
pb	Pares de base
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PVC	Polyvinylchlorine
Rap-Test	Teste de produção de anticorpos em ratos
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Trascriptase reversa
RT-PCR	Reação da polimerase em cadeia com transcrição reversa
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SPF	“specific pathogen free”
TAE	Tampão Tris – Acetato
TMEV-GDVII	Vírus da encefalomielite murina de Theiler –cepa GDVII
VHEV	Vírus da encefalomielite humana de Vilyuisk
VPg	Proteína viral ligada ao genoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura e organização do genoma dos <i>Picornavirus</i>	05
Figura 2.	Monocamada de células BHK-21 (100x).....	28
Figura 3.	Efeito citopático após 24 horas de infecção com TMEV-GDVII em monocamada de células BHK-21 (200x).....	29
Figura 4.	Imunofluorescência indireta. Células BHK-21 infectadas por TMEV-GDVII (400x).....	30
Figura 5.	À esquerda: Camundongo neonato BALB/c/Uni (3 dias idade) inoculado com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, com perda de peso e paralisia (2° dpi). À direita: Camundongo neonato BALB/c/Uni normal com 3 dias de idade.....	34
Figura 6.	Camundongo neonato BALB/c/Uni (3 dias idade) inoculado com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII. Paralisia e perda de peso(2° dpi).....	34
Figura 7.	Camundongo neonato BALB/c/Uni inoculado com cepa padrão TMEV-GDVII. Paralisia das patas e perda de peso (4° dpi).....	35
Figura 8.	Rato WISTAR/Uni normal com 11 dias de idade.....	35
Figura 9.	Rato WISTAR/Uni (11 dias idade) inoculado com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII. Pêlos arrepiados e paralisia das patas posteriores (9° dpi).....	36
Figura 10	Rato WISTAR/Uni normal com 5 dias de idade.....	36
Figura 11	Rato WISTAR/Uni (4 dias idade) inoculado com a cepa padrão TMEV-GDVII. Perda de peso e paralisia das patas posteriores (2° dpi).....	37
Figura 12	Eletoforese em gel de agarose 1,5%. Padronização da concentração de <i>primers</i> 1 e 2 para TMEV-GDVII.....	42
Figura 13	Eletoforese em gel de agarose 1,5%. Padronização da concentração de <i>primers</i> 1 e 2 para EMCV.....	43
Figura 14	Eletoforese em gel de agarose 1,5%. Produto amplificado com tamanho aproximado de 283 pb (TMEV) com <i>primers</i> 1 e 2 de amostras de cérebro de camundongos inoculados com suspensão intestinal e TMEV-GDVII.....	44

Figura 15	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produtos amplificados com tamanhos entre 283 pb (TMEV) e 284 pb (EMCV) obtidos com <i>primers</i> 1 e 2 em amostras de cérebro de ratos normais e inoculados com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII e com a cepa padrão.....	45
Figura 16	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produtos amplificados com tamanhos entre 283 pb (TMEV) e 284 pb (EMCV) obtidos com <i>primers</i> 1 e 2 em amostras de fezes de ratos provenientes de diferentes colônias convencionais.....	46
Figura 17	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produtos amplificados com tamanhos entre 283 pb (TMEV) e 284 pb (EMCV) com <i>primers</i> 1 e 2 em amostras de fezes de ratos provenientes de uma colônia convencional (Biotério D).....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	<i>Primers</i> selecionados para reação de RT-PCR para identificação de <i>Cardiovirus</i> (TMEV e EMCV).....	27
Quadro 2.	Títulos de anticorpos obtidos pela reação de imunofluorescência indireta de camundongos e ratos imunizados com TMEV-GDVII.....	31
Quadro 3.	Caracterização dos sinais clínicos em camundongos neonatos BALB/c/Uni, após inoculação intracerebral com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII – 1 ^a e 2 ^a passagens.....	32
Quadro 4.	Caracterização dos sinais clínicos em ratos neonatos WISTAR/Uni, após inoculação intracerebral com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII – 1 ^a e 2 ^a passagens.....	33
Quadro 5.	Sinais clínicos em camundongos neonatos BALB/c/Uni inoculados com a cepa padrão TMEV-GDVII.....	38
Quadro 6.	Sinais clínicos em ratos WISTAR/Uni neonatos inoculados com a cepa padrão TMEV-GDVII.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Amostras de cérebros de camundongos testadas pela reação de RT-PCR com <i>primers</i> P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.....	39
Tabela 2.	Amostras de cérebros de ratos testadas pela reação de RT-PCR com <i>primers</i> P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.....	40
Tabela 3.	Amostras de sobrenadantes de células testadas pela reação de RT-PCR com <i>primers</i> P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.....	40
Tabela 4.	Amostras de suspensão fecal e intestinal de ratos de diferentes biotérios convencionais, testadas pela reação de RT-PCR com <i>primers</i> P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.....	41

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Linhagem celular.....	15
3.2. Produção do antígeno viral.....	15
3.3. Determinação da dose infectante 50% em cultura de tecido (DICT 50%).....	16
3.4. Purificação parcial do vírus TMEV-GDVII.....	16
3.5. Dosagem de proteínas.....	17
3.6. Produção de soros policlonais anti-TMEV-GDVII em camundongos e ratos....	17
3.7. Reação de Imunofluorescência Indireta.....	18
3.8. Reação de Soroneutralização.....	19
3.9. Obtenção de material biológico de ratos provenientes de colônias convencionais.....	20
3.9.1. Obtenção de amostras de plasma.....	20
3.9.2. Obtenção de amostras de fezes.....	20
3.9.3. Obtenção da suspensão intestinal.....	21
3.10. RAP-TEST.....	21
3.11. Inoculação da suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV- GDVII em células BHK-21.....	22
3.12. Inoculação da suspensão intestinal e da cepa padrão TMEV-GDVII em camundongos e ratos neonatos.....	23
3.13. Inoculação de suspensão cerebral em células BHK-21.....	24
3.14. Extração do RNA viral.....	24
3.15. Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).....	25
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Determinação da dose infectante 50% em cultura de tecido (DICT 50%).....	28

4.2. Concentração de partículas virais em gradiente de sacarose.....	29
4.3. Imunofluorescência indireta.....	30
4.4. Ensaio de Soroneutralização.....	31
4.5. Teste da produção de anticorpos em ratos (RAP-TEST).....	31
4.6. Isolamento do vírus TMEV.....	32
4.6.1. Em cultura de células.....	32
4.6.2. Em camundongos e ratos neonatos.....	32
4.7. Inoculação da suspensão cerebral em células BHK-21.....	37
4.8. Inoculação da cepa padrão TMEV-GDVII em camundongos e ratos neonatos.	38
4.9. Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).....	39
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
8. ANEXOS.....	74
8.1. Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal.....	75
8.2. Análise filogenética da sequência de RNA do isolado NGS910.....	76

RESUMO

O vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) é um patógeno entérico de camundongos, pertencente ao gênero *Cardiovirus* da família *Picornaviridae*. O TMEV é um vírus não envelopado, icosaédrico, com 20 - 30 nm e genoma constituído de RNA fita simples com polaridade positiva. Os TMEV têm sido classificados em dois subgrupos, de acordo com sua atividade biológica após inoculação intracerebral. Cepas neurovirulentas (GDVII e FA) induzem uma encefalite aguda e fatal, enquanto aquelas de baixa virulência (TO, WW, DA e BeAn) persistem no sistema nervoso central, induzindo doença crônica, caracterizada por desmielinização.

A infecção natural por TMEV tem sido demonstrada em colônias convencionais de camundongos e, em sua maioria, a infecção é assintomática. Embora o TMEV seja descrito como um patógeno de camundongos, anticorpos para TMEV-GDVII têm sido detectados em soros de ratos provenientes de biotérios que mantêm colônias convencionais. A prevalência da infecção por TMEV-GDVII nestas colônias de ratos é alta, em torno de 54,6%. Assim, este trabalho teve por finalidade demonstrar, por métodos sorológicos e molecular, a infecção natural por TMEV em colônias de ratos. Soros destes animais foram analisados pela reação de imunofluorescência indireta e a presença de anticorpos anti-TMEV-GDVII foi detectada em 86,3% deles. Ao mesmo tempo, pelo teste de soroneutralização, 77,2% destes soros demonstraram anticorpos neutralizantes para TMEV-GDVII. Com o objetivo de isolar o vírus de ratos, sistemas “*in vitro*” e “*in vivo*” foram utilizados. Nove passagens sucessivas de amostras de suspensão intestinal foram feitas em células BHK-21 e não foi possível demonstrar efeito citopático. Sinais clínicos da infecção por TMEV em camundongos, ou seja, paralisia das patas posteriores e tremores, foram demonstrados em camundongos e ratos neonatos inoculados com suspensão intestinal de ratos soropositivos e com a cepa padrão de TMEV-GDVII. Os resultados da RT-PCR demonstraram a presença de RNA viral em amostras de cérebro de ratos inoculados com a suspensão intestinal, com TMEV-GDVII e nas amostras de fezes de ratos provenientes de diferentes biotérios convencionais. Os resultados demonstram que ratos se infectam naturalmente por TMEV e, embora hajam poucas descrições na literatura da interferência deste vírus em pesquisas biomédicas, a monitoração sanitária para TMEV em biotérios que mantêm colônias de ratos deve ser incluída.

ABSTRACT

Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) is an enteric pathogen of mice and belongs to the *Cardiovirus* genus in the family *Picornaviridae*. TMEV is a non-enveloped, icosahedral virus with 20 – 30 nm size and it has an RNA positive sense genome. TMEV has been divided in two subgroups on the basis of their biological activities after intracerebral inoculation. Neurovirulent strains (GDVII and FA) causes an acute and fatal encephalitis in mice and in contrast, low neurovirulent strains (DA, BeAn 8386, WW and TO) causes a persistent infection in the central nervous system and produce a chronic disease characterized by demyelination. TMEV infection with low neurovirulent strains has been used as an experimental model to help the studies on demyelination process induced by virus infection and to study diseases as Multiple Sclerosis. The natural infection by TMEV has been related in conventional colonies of mice and it's frequently asymptomatic. Although TMEV has been described as a pathogen of mice, antibodies against TMEV-GDVII has been detected in serum of rats reared in non-barrier colonies. Facing this, the purpose of the present study was to demonstrate the natural infection of TMEV in rat colonies through serological and molecular methods (RT-PCR). The rat serum were analysed by indirect immunofluorescence assay and antibodies against TMEV-GDVII were detected in 86,3% of the serum analysed. In the neutralization assay, 77,2% of the same serum showed neutralizing antibodies anti TMEV-GDVII. To further isolate this rat virus, "in vitro" and "in vivo" systems were used. Nine blind passages of the intestinal suspension were realized in BHK-21 cells, but no cytopathic effect was identified. Clinical signs of TMEV infection in mice were characterized by flaccid paralysis of hind legs and tremor when newborn rats and mice were inoculated with intestinal suspension of seropositive rats and with the prototype strain of TMEV-GDVII. The RT-PCR results showed the RNA genome in the brain samples of rats and mice inoculated both with the intestinal suspension and the prototype strain. In the fecal samples, the RNA genome was also detected. In summary, rats can be naturally infected by TMEV and although there are a few examples in the literature of TMEV infection interference with biomedical researches, a health monitoring program for TMEV should be included in the rat colonies.

1. INTRODUÇÃO

A presença de agentes infecciosos em colônias de animais de laboratório representa um sério problema na pesquisa biomédica. Alguns microorganismos são patogênicos e podem induzir sinais clínicos ou causarem infecções subclínicas e/ou assintomáticas. A preocupação com a presença destes agentes se dá não apenas pelo fato de alterarem parâmetros fisiológicos, mas também por levarem a alterações significativas em resultados experimentais (Hsu *et al.*, 1979; Hansen, 1994; Gilioli, 1996; Jacoby & Lindsey, 1997; Baker, 1998; Nicklas *et al.*, 1999). Sendo assim, é importante salientar a importância da implantação de um programa de monitoração microbiológica, com o objetivo de certificar colônias de camundongos e ratos livres de patógenos primários e secundários, além de certificar a eficiência dos sistemas de barreiras adotados (Rehbinder, 1994; Gilioli, 2003).

A prevalência de infecções virais, bacterianas e parasitárias foi analisada em estudos realizados por Gilioli *et al.* (1996, 2000) e Gilioli (2003), que objetivaram avaliar as condições higiênico-sanitárias de colônias de camundongos e ratos mantidas sob sistema de barreiras e em colônias convencionais de diferentes biotérios brasileiros. Foram analisados 18 biotérios e somente um deles era capaz de fornecer animais livres de infecções virais, bacterianas e parasitárias. Perfil semelhante quanto à prevalência de infecções por agentes infecciosos também foi constatado em Universidades e Institutos dos E.U.A, Alemanha e Canadá (Descoteaux, *et al.*, 1977; Kraft & Meyer, 1990; Jacoby & Lindsey, 1997; Zenner & Regnault, 2000).

Dentre os diferentes vírus murinos presentes em colônias de camundongos destaca-se o vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV), primeiramente descrito por Max Theiler na década de 30 durante estudos com o vírus da febre amarela. Este autor descreveu uma doença neurológica em camundongos com sintomas de paralisia flácida das patas posteriores, transmissível para camundongos normais por inoculação intracerebral causada por um vírus capaz de persistir no sistema nervoso central (Theiler, 1934; 1937).

O estudo da encefalomielite espontânea em camundongos foi intensificado pelo fato da doença apresentar semelhanças clínicas e epidemiológicas com a poliomielite humana (Olitsky, 1945; Rueckert, 1996).

O vírus foi inicialmente designado como cepa TO (Theiler's original), tendo sido isolado de fezes e do trato gastrointestinal de camundongos normais (Theiler & Gard, 1940a). Além da cepa TO, Theiler & Gard (1940a) isolaram, durante experimentos realizados com o vírus da febre amarela, outras duas cepas com características diferentes da cepa original que foram denominadas GDVII e FA. Estas cepas foram relatadas como altamente virulentas e capazes de causar meningoencefalite e morte, quando comparadas com a cepa TO (Olitsky, 1940).

Daniels *et al.* (1952) identificaram uma nova cepa, denominada DA (Daniels), semelhante à cepa TO. Após a inoculação intracerebral foram observados dois tipos de lesões em camundongos adultos, caracterizadas por polioencefalomielite aguda e desmielinização crônica da corda espinhal. Este relato foi considerado como a primeira descrição de desmielinização induzida por vírus.

Uma grande variedade de vírus, dentre eles o vírus da hepatite do camundongo (MHV) e o vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV), têm sido correlacionados com a patogênese de algumas doenças que envolvem desmielinização primária (Miller, 1992). Modelos animais foram desenvolvidos para estudos de desmielinização induzida por vírus e para melhor entender os mecanismos e patologias relacionadas a vírus, como a Esclerose Múltipla (Miller, 1992; Goverman & Brabb, 1996).

Lipton (1975) descreveu e confirmou a ocorrência de desmielinização na infecção por TMEV com a cepa DA e caracterizou a doença como bifásica. Após inoculação intracerebral foi observado um envolvimento neuronal agudo com paralisia flácida e, posteriormente, a presença de uma lesão inflamatória nas leptomeninges da corda espinhal e da massa branca. Este fato indicava que durante a infecção aguda o vírus replicava-se em neurônios da massa cinzenta na corda espinhal e, 30 dias após a infecção, o antígeno viral poderia ser detectado apenas na massa branca da corda espinhal e era capaz de induzir uma infecção persistente. Os achados histopatológicos presentes no processo inicial da doença mostraram alterações degenerativas nos neurônios, proliferação das células da microglia e infiltrado perivascular na corda espinhal e tálamo.

Diante destas observações, os TMEV foram divididos em dois grupos, de acordo com suas propriedades patogênicas após inoculação intracerebral. Em um dos grupos estão

incluídas as cepas altamente virulentas GDVII e FA, que produzem uma encefalite fatal em camundongos. No segundo grupo estão as cepas menos virulentas, DA, WW, BeAn 8386 e TO, que desenvolvem uma doença bifásica, caracterizada por infecção persistente do sistema nervoso central, na forma de poliomielite aguda, seguida por um processo desmielinizante crônico e inflamatório (Lipton, 1975).

Em um estudo utilizando microscopia eletrônica, Friedmann & Lipton (1980) e Lorch *et al.* (1981) demonstraram que os dois grupos de TMEV diferem em sua organização intracelular em estágios avançados da infecção em células BHK-21, de acordo com as descrições encontradas na literatura para outros *Picornavirus* (Dales *et al.*, 1965). A cepa GDVII forma arranjos cristalinos dentro do citoplasma celular, enquanto que a cepa DA mostra arranjos alinhados da partícula viral entre as duas camadas da membrana celular. Embora ambos os grupos apresentem similaridades antigênicas, os achados sugerem que os dois grupos de TMEV sejam geneticamente distintos.

O TMEV é um patógeno entérico de camundongos, pertencente ao gênero *Cardiovirus*, na família *Picornaviridae*, inicialmente classificado como *Enterovirus*, devido similaridades quanto à epidemiologia e patogênese com o vírus da poliomielite humana (Rueckert, 1996). A análise da sequência de nucleotídeos dos vírus da família *Picornaviridae* tornou possível verificar a homologia entre genes da região P3 (3C e 3D) de diferentes vírus desta família. TMEV e EMCV, vírus da encefalomiocardite, um vírus protótipo do gênero *Cardiovirus*, mostraram homologia de 57,7% (Ozden *et al.*, 1986). De acordo com estas observações foi proposto que a classificação do TMEV fosse reconsiderada e que este vírus fosse classificado como *Cardiovirus* (Pevear *et al.*, 1987).

O TMEV é um vírus não envelopado, apresenta tamanho aproximado de 20-30 nm, nucleocapsídeo icosaédrico e um genoma constituído de RNA fita simples com polaridade positiva. O tamanho do RNA varia entre 7,2 a 8,5 kilobases (Kb) e o genoma apresenta em torno de 8100 nucleotídeos. O RNA dos vírus da família *Picornaviridae* apresenta regiões não codificantes nas terminações 3' e 5'. A região 3' é poliadenilada e a região 5', com 1065 a 1069 nucleotídeos, é covalentemente ligada a uma proteína denominada VPg. Embora alguns autores descrevam que a função desta proteína seja ainda pouca estudada, sabe-se que na maioria dos *Picornavirus* a VPg, com uma sequência de 22 aminoácidos, tem o papel

de iniciar a síntese do RNA. A proteína 3AB, precursora da VPg e também responsável por iniciar a síntese, é clivada pela protease 3C para formar VPg-RNA, através de um processo conhecido por Uridilação, ou seja, a inserção da base Uracila à VPg. Em *Cardiovirus*, a função da VPg está relacionada à persistência e neurovirulência (Larsen *et al.*, 1980; Flint *et al.*, 2000 a e b).

Entre as duas áreas não codificantes do genoma há um uma região de leitura (ORF - Open reading frame) que é traduzida em uma poliproteína, a qual é clivada em diferentes etapas do processo de tradução para produzir as proteínas estruturais e não estruturais. Esta poliproteína, com aproximadamente 2300 aminoácidos é, em seguida, clivada em uma proteína denominada leader (L), presente somente nos *Cardiovirus* e *Aphthovirus*, e também em regiões denominadas P1, P2, P3, conforme demonstrado na figura 1 (Rueckert, 1996).

As funções da proteína L têm sido alvo de alguns estudos e acredita-se que esta possa ser importante no processo de replicação viral e talvez por determinar a persistência das cepas menos virulentas no sistema nervoso central. Kong *et al.* (1994) demonstraram que na cepa DA, a proteína L não é necessária para que ocorra a infecção viral em algumas linhagens celulares, enquanto que para outras linhagens é imprescindível, como demonstrado por Obuchi *et al.* (2000) em linhagens de macrófagos (J774-1). Cepas de baixa virulência produzem esta proteína, com 18kDa, por apresentarem o códon de iniciação AUG, o que não ocorre com as cepas altamente virulentas que apresentam o códon ACG (Roos *et al.*, 1989; Michiels *et al.*, 1995). Alguns estudos sugerem que esta região de leitura alternada possa ter uma implicação na virulência ou na atividade biológica destas cepas (Kong *et al.*, 1994).

As regiões P2 e P3 são clivadas para originar as proteínas virais acessórias envolvidas na síntese do RNA viral e a região P1 origina as proteínas do capsídeo (VP1, VP2, VP3 e VP4). A região P2 é clivada em proteínas não estruturais, denominadas 2A, 2B e 2C, sendo a 2C possivelmente uma helicase, responsável por “ancorar” a RNA polimerase à membrana celular. A região P3 é clivada em proteínas não estruturais, 3AB, 3C e 3D, sendo a proteína 3AB uma precursora da VPg e geralmente sofre a ação da proteína 3C para formar RNA-VPg. A proteína 3CD apresenta importante papel na síntese do RNA viral sendo a precursora de 3C, uma protease viral, e da 3D, uma RNA polimerase (Roos *et al.*, 1989; Flint *et al.*, 2000 b).

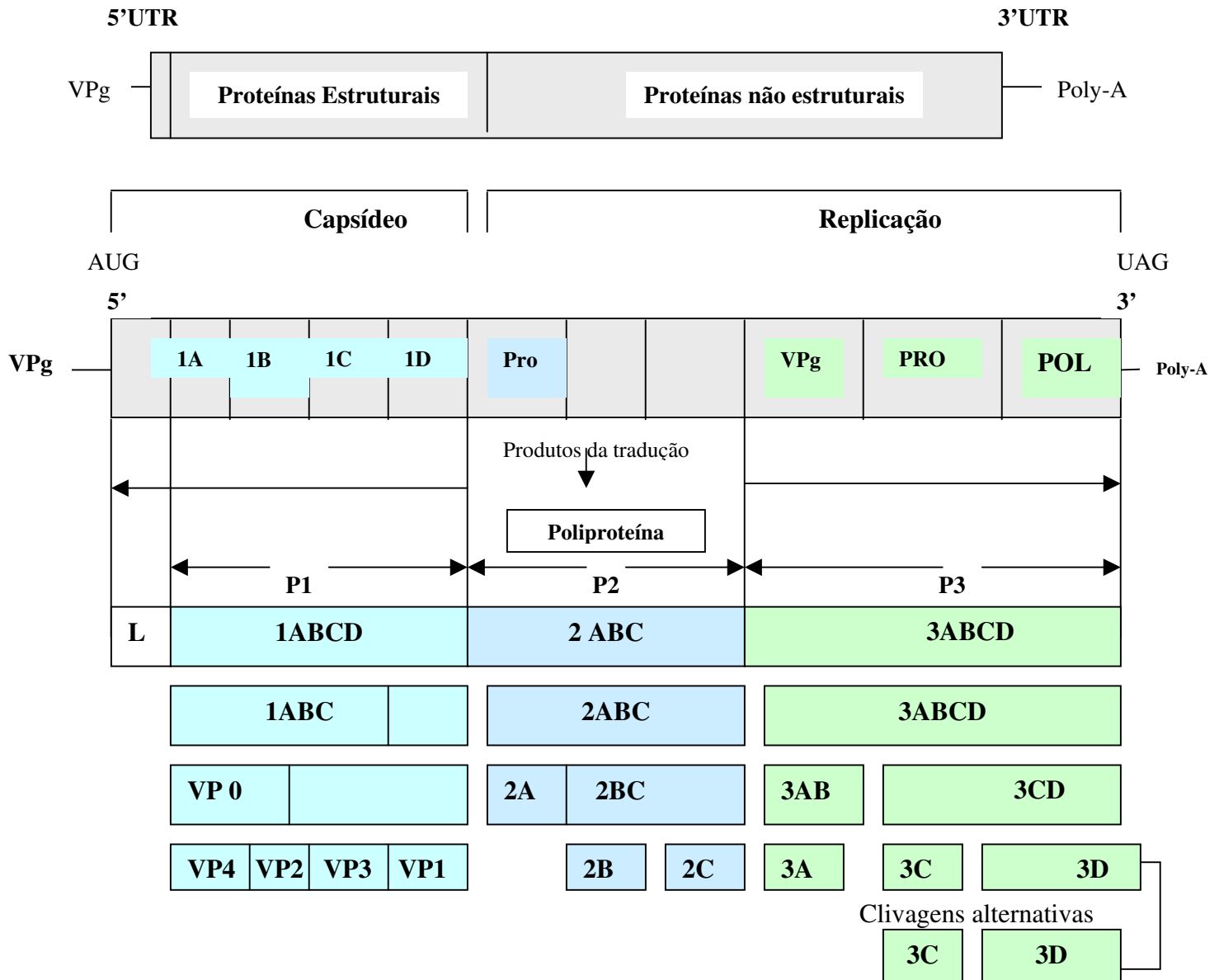


Figura 1. Estrutura e organização do genoma dos *Picornavirus* (Segundo Rueckert, 1996).

O vírion contém quatro polipeptídeos estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4), com pesos moleculares de 37kDa, 34kDa, 27kDa e 6kDa, respectivamente (Lipton & Friedmann, 1980). Estes mesmos autores demonstraram que o tratamento com tripsina é capaz de clivar um fragmento de 2kDa da VP1 apenas das cepas menos virulentas.

Cepas menos virulentas induzem sinais clínicos de acordo com a idade do animal (Theiler, 1937). Camundongos recém-desmamados morrem entre dois a três dias após inoculação, mas não apresentam sintomas de paralisia. Em animais mais velhos, após um período de 7 a 30 dias, foi observada fraqueza das patas dianteiras que progredia para paralisia das patas posteriores e, algumas vezes, para a morte. Um outro sinal clínico frequentemente observado é a incontinência urinária (Downs, 1982; Lipton & Rohzon, 1986).

As cepas virulentas (GDVII e FA) diferem das outras cepas por induzirem infecções com curto período de incubação (Theiler & Gard, 1940b). Camundongos inoculados pela via intracerebral com a cepa GDVII apresentam encefalite e morrem entre 24 - 48 horas. Animais infectados apresentam como sinais clínicos: perda de peso, pelos arrepiados, postura curvada e hiperexcitabilidade. Paralisia flácida das patas dianteiras e posteriores é frequentemente observada (Downs, 1982; Lipton & Rohzon, 1986).

Dentro do gênero *Cardiovirus* outros vírus são conhecidos por infectar os roedores (Lipton & Rohzon, 1986). O vírus da encefalomiocardite (EMCV) foi inicialmente isolado de ratos silvestres da espécie *Sigmodon hispidus* (Vanella *et al.*, 1956; Kilhan *et al.*, 1956). O EMCV também foi isolado de outros mamíferos, pássaros e insetos em diferentes regiões do mundo. Embora a infecção por este vírus tenha sido associada a casos de meningite asséptica e encefalite em humanos, e a casos de infecção epizootica em suínos com miocardite fatal, há indícios de que os roedores sejam os reservatórios naturais da infecção por EMCV (Tesh & Wallace, 1978).

Já o vírus da encefalomielite humana de Vilyuisk (VHEV), pertencente à espécie *Theilovirus*, foi inicialmente descrito por causar uma doença neurológica degenerativa na população do vale de Vilyuy, na Sibéria. Casals (1963) demonstrou que o VHEV reagia cruzadamente com TMEV e EMCV, embora fracamente com este último vírus pela reação de fixação de complemento. Diante desta observação, algumas regiões do genoma, como a região 5' não codificante, proteína leader e regiões codificantes para proteínas do capsídeo foram seqüenciadas. Os resultados demonstraram que a região 5', proteína leader e a região VP4 do VHEV apresentavam aproximadamente 90% de identidade com a seqüência de TMEV (cepa GDVII) e somente 40 – 65% de similaridade com a seqüência do EMCV (Pritchard *et al.*, 1992). Por outro lado, discute-se quanto aos hospedeiros, ou seja, se realmente este vírus

é um patógeno de humanos, capaz de causar disfunções do sistema nervoso central ou se, possivelmente, um TMEV coincidentemente isolado durante passagens em camundongos, ou até um recombinante entre as duas espécies (Pritchard *et al.*, 1992).

Ainda dentro dos *Cardiovirus*, a existência de uma possível infecção por TMEV em cobaias, associada a sintomas clínicos de fraqueza progressiva na parte posterior, caquexia e morte em torno de 1 a 4 semanas, foi inicialmente descrita em 1911 (Hansen *et al.*, 1997). Pouca atenção foi dada às possíveis causas da doença, uma vez que o tratamento com ácido ascórbico era capaz de reverter o quadro clínico. Em 1997, Hansen *et al.* demonstraram que cobaias apresentando sintomas de fraqueza se recuperavam após tratamento com vitamina C fornecida na água, sugerindo que cobaias com possíveis deficiências desta vitamina, poderiam estar predispostas a desenvolverem doença desmielinizante, similarmente aos sintomas observados em camundongos infectados com TMEV. Entretanto, a correlação entre a doença e a presença de anticorpos contra TMEV em cobaias com estes sintomas clínicos, sugeria não só pela presença de um patógeno do gênero *Cardiovirus*, mas demonstrava a necessidade de monitoração da infecção por TMEV em colônias de cobaias (Hansen *et al.*, 1997, 2000).

Lipton *et al.* (2001), analisando soros de roedores silvestres (*Mus musculus*) de quatro localidades nos Estados Unidos e uma na Rússia para a presença de anticorpos anti-TMEV, demonstraram que mais de 50% dos soros das cinco localidades apresentavam positividade no ensaio imunoenzimático, sugerindo, portanto, que *Mus musculus* também seria o hospedeiro natural na infecção por TMEV.

A infecção natural por TMEV é inaparente, ocorre primariamente no trato gastrointestinal (Downs, 1982; Lipton & Rohzon, 1986) e tem sido freqüentemente demonstrada em colônias de camundongos mantidos em biotérios sem sistema de barreiras sanitárias. Em um estudo sorológico realizado em cinco colônias de camundongos do Canadá, Descoteaux *et al.* (1977) demonstraram que todas apresentavam anticorpos para TMEV-GDVII, com porcentagem de positividade entre 17% e 100%. Jacoby & Lindsey (1997) estudaram a prevalência de agentes infecciosos em colônias de camundongos e ratos SPF e convencionais de 72 Instituições de pesquisas biomédicas dos Estados Unidos. A prevalência de infecção em colônias de camundongos foi de 35%, enquanto que as colônias de ratos SPF e convencionais mostraram infectividade de 8% e 20%, respectivamente. Perfil semelhante

quanto à prevalência destes agentes também foi observado por Zenner & Regnault (2000), em um levantamento realizado em um período de 10 anos nas colônias de camundongos e ratos da França. Os resultados mostraram que a prevalência de anticorpos para TMEV-GDVII em colônias de camundongos foi de 47,8% e em colônias de ratos foi de 44,4%.

Do ponto de vista nacional, Gilioli *et al.* (1996) e Gilioli (2003), em levantamento realizado em colônias de camundongos e ratos de biotérios brasileiros, demonstraram que a prevalência de infecção por TMEV-GDVII em colônias de camundongos mantém-se alta (70,6%) e que em colônias de ratos seria de 54,6%.

O TMEV é transmitido pela via oral-fecal. Após replicação nas células epiteliais do intestino delgado, segue uma viremia transitória que é acompanhada por uma resposta imune do hospedeiro (Lipton & Rohzon, 1986). Segundo Brownstein *et al.* (1989), há poucas informações na literatura relacionadas ao tempo de infecção por TMEV, quando adquirida naturalmente. Os resultados obtidos com camundongos naturalmente infectados sugerem uma variação no tempo de excreção do vírus (entre 49 – 154 dias), o que está de acordo com Theiler & Gard (1940b) que reportaram que o TMEV pode ser isolado das fezes em intervalos de tempos variáveis (até mais que 53 dias) e que a excreção fecal é intermitente.

O vírus é encontrado em baixos títulos na mucosa intestinal e no conteúdo fecal de camundongos infectados podendo ser detectado em animais jovens com idade entre 20 dias ou mais, persistindo no hospedeiro por período indeterminado, sugerindo que o aumento da resistência à infecção ocorre de acordo com o aumento da idade (Olitsky, 1940; Theiler & Gard, 1940b).

A doença clínica na infecção por TMEV pode apresentar três tipos de respostas, caracterizadas por: encefalite, poliomielite e doença desmielinizante. A manifestação da doença depende do isolado, da via de inoculação e do genótipo do hospedeiro (Downs, 1982). Os sinais clínicos só se manifestam após inoculação intracerebral, como observado por Theiler, 1937.

Após inoculação intracerebral, a cepa DA é capaz de infectar neurônios na massa cinzenta e células da glia na massa branca, enquanto que a cepa GDVII não infecta a massa branca da medula espinhal, além de não persistir no hospedeiro. Embora as vias de disseminação do TMEV no sistema nervoso central tenham sido pouco estudadas, há indicações que estes vírus utilizem transporte axonal. Estudos demonstram que tanto a cepa DA quanto a cepa GDVII utilizam transporte axonal, embora a inabilidade da cepa GDVII em infectar a massa branca, e não causar persistência no hospedeiro, possam estar associadas à presença de receptores que sejam determinantes da persistência (Martinat *et al.*, 1999).

É interessante destacar que, embora as cepas destes dois grupos causem diferentes padrões de doença, as mesmas apresentam homologia em torno de 90 – 95% quanto a sequência de nucleotídeos e aminoácidos (Pevear *et al.*, 1988).

A identificação dos genes ou dos produtos gênicos responsáveis pelas diferenças biológicas entre as cepas de TMEV foi de grande importância para entender o processo de desmielinização. Estudos utilizando quimeras recombinantes das cepas menos virulentas foram capazes de demonstrar os determinantes para a desmielinização (Fu *et al.*, 1990). Neste estudo, os autores sugerem que todas as cepas de TMEV codificam um determinante para a desmielinização, embora este processo não seja observado com cepas virulentas (GDVII), talvez por induzir uma doença aguda e letal.

Os mecanismos de patogenicidade envolvidos nas diferenças entre as cepas de TMEV ainda não estão bem estabelecidos. Na infecção com a cepa DA acredita-se que os mecanismos envolvidos no processo de desmielinização possam estar relacionados com uma resposta imune mediada por células T, uma vez que com sua depleção “in vivo”, o processo de desmielinização na infecção crônica é reduzido. Tsunoda *et al.* (1996) sugerem que a resposta imune do hospedeiro seja um dos determinantes para a diversidade de sintomas nas infecções por TMEV.

Por outro lado, a identificação dos determinantes para a persistência viral também foi importante no sentido de verificar as diferenças biológicas entre as cepas de TMEV. A estrutura tri-dimensional da cepa virulenta TMEV-GDVII foi demonstrada por cristalografia em raios-X e, quando comparada com as cepas BeAn e DA, foram identificadas diferenças estruturais que sugerem que alguns sítios localizados nas proteínas do capsídeo viral

podem apresentar um papel funcional na persistência do TMEV (Luo *et al.*, 1996; Luo, 1997). A utilização de variantes atenuadas da cepa GDVII auxiliou na identificação destes determinantes, uma vez que quando cepas quiméricas de GDVII tiveram o capsídeo substituído por um complexo protéico da cepa DA as mesmas induziram infecção persistente (Tangy *et al.*, 1991). Neste contexto, a natureza das células infectadas em que o vírus persiste tem sido bem estudada, embora haja discrepâncias na literatura (Cash *et al.*, 1985; Lipton *et al.*, 1995).

Na doença desmielinizante crônica, o antígeno viral foi observado em macrófagos e astrócitos e não em oligodendrócitos ou células de Schwann, as células axonais remielinizantes (Dal Canto & Lipton, 1982). Por outro lado, Rodriguez *et al.* (1983) reportaram que oligodendrócitos eram as células alvo na infecção por TMEV. Em concordância com estas observações, Brahic (2002) publicou que oligodendrócitos, e astrócitos em menor extensão, também são infectados e apresentam importante papel no estabelecimento da infecção persistente.

Lipton *et al.* (1995) e Pena-Rossi *et al.* (1997), verificando a natureza das células infectadas por ensaios imunoenzimáticos e hibridização “*in situ*”, em diferentes tempos após inoculação, demonstraram que o vírus poderia ser encontrado, nas primeiras semanas após inoculação, na massa cinzenta do cérebro, principalmente em neurônios e, em seguida, em menor extensão, na massa branca. Embora astrócitos e oligodendrócitos também tenham sido encontrados como infectados, seus achados mostram que macrófagos são células fundamentais no estabelecimento da infecção persistente. Estas células representariam a maioria das células infectadas no 21º dia após inoculação, onde seria possível detectar grandes quantidades de RNA viral e baixas quantidades de partículas virais infecciosas (Trottier *et al.*, 2001).

A extensão da patologia induzida por TMEV depende não somente da via de inoculação como também da cepa do vírus e do “background” genético do hospedeiro. Lipton & Dal Canto (1979) demonstraram que animais isogênicos e heterogênicos diferem quanto à susceptibilidade ao TMEV. As linhagens SJL/J e DBA/2 são altamente susceptíveis à desmielinização, enquanto que as linhagens BALB/c e C57Bl/6 são totalmente resistentes. Em camundongos C57Bl/6, o “clearance” viral ocorre dentro de 10 a 15 dias após

inoculação intracerebral, sem replicação do vírus na massa branca (Brahic & Bureau, 1998).

A identificação dos genes responsáveis pela susceptibilidade à infecção persistente e à desmielinização foi demonstrada por análises imunogenéticas que revelaram que estariam relacionadas a múltiplos *loci*. Um dos *locus* está localizado na região H-2D, no complexo maior de histocompatibilidade (MHC) (Clatch *et al.*, 1985; Bureau *et al.*, 1992; Fiette *et al.*, 1993; Brahic & Bureau, 1998). O papel destes genes foi demonstrado em diversas linhagens de camundongos transgênicos, como relatado por Fiette *et al.* (1993), que avaliaram o papel das células TCD8⁺ em camundongos deficientes para o gene β 2-microglobulina. Estes animais não expressavam moléculas de MHC-classe I e, ao mesmo tempo, apresentavam uma deficiência em células TCD8⁺, não sendo capazes de eliminar a infecção viral.

A utilização de camundongos nudes atímicos, um modelo para imunodeficiência de linfócitos T, tem sido importante para elucidar o papel do sistema imune no desenvolvimento da desmielinização induzida por TMEV. Roos & Wollmann (1984) e Rosenthal *et al.* (1986) demonstraram que estes animais não foram capazes de produzir anticorpos anti-TMEV. Da mesma forma, quando camundongos BALB/c nude foram infectados pela via intracerebral com a cepa DA, lesões desmielinizantes da corda espinhal e infecção em oligodendrócitos e neurônios puderam ser observadas, sugerindo que a infecção lítica de oligodendrócitos é suficiente para induzir doença desmielinizante em camundongos atímicos.

Miller *et al.* (1987) demonstraram que a doença desmielinizante na infecção por TMEV está relacionada com a resposta ao MHC-classe II e resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (Clatch *et al.*, 1986). Estes autores propuseram que células TCD4⁺ ativam macrófagos pela liberação de linfocinas e, por sua vez, induzem uma destruição inespecífica da mielina.

Estudos foram realizados para determinar as regiões do genoma do TMEV responsáveis pela resposta imune contra a bainha de mielina, na tentativa de identificar os epítomos virais envolvidos na ativação das células T e na produção de anticorpos (Cameron *et al.*, 2001). Os sítios antigênicos neutralizantes no TMEV estão localizados na VP1, portanto, o tratamento com anticorpos neutralizantes anti-VP1 foi capaz de reduzir a extensão da infecção e aumentar a sobrevivência dos animais infectados (Fujinami *et al.*, 1989; Nitayaphan *et al.*,

1985 a, b).

A resposta imune humoral à infecção por TMEV é capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes no sistema nervoso central e eliminar os vírus (Yamada *et al.*, 1991). Anticorpos são formados na primeira semana após infecção e podem ser encontrados no soro e no líquido cérebro-espinhal (Rodriguez *et al.*, 1988; Brahic, 2002).

Pena-Rossi *et al.* (1991) demonstraram, após a transferência passiva de soro de camundongos C57Bl/6 (linhagens resistentes) para camundongos SJL/J (linhagens susceptíveis), uma redução no número de células infectadas na medula espinhal, confirmando a importância da resposta imune humoral na fase inicial da infecção.

O diagnóstico da infecção por TMEV pode ser realizado por diferentes métodos sorológicos. O teste de inibição da hemaglutinação foi amplamente utilizado durante os primeiros trabalhos com este vírus para a detecção de anticorpos anti-TMEV, com o uso de hemáceas humanas do tipo O (Lahelle & Horsfall, 1949; Fastier, 1951a). Atualmente esta técnica não é empregada como método de diagnóstico para TMEV, devido a resultados falsos positivos possivelmente pela presença de inibidores inespecíficos (Fastier, 1951b; Desconteaux *et al.*, 1977; Kraft & Meyer, 1986).

Kraft & Meyer (1986), Gilioli *et al.* (1996) e Gilioli (2003) demonstraram que o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI) é um método sensível e específico para a detecção de anticorpos contra vírus murinos, dentre eles o TMEV, embora reações imunoenzimáticas sejam recomendadas e mais comumente utilizadas (Kraft & Meyer, 1986).

O isolamento viral também pode ser um método alternativo de diagnóstico, sendo empregado quando há a suspeita da presença do vírus ou um histórico de paralisia nas colônias. Geralmente, o isolamento é feito a partir de amostras de cérebro ou corda espinhal de animais com sinais clínicos da doença. O sucesso no isolamento também é obtido com suspensão de intestino delgado e conteúdo fecal de animais com infecções assintomáticas. A utilização de animais recém-nascidos pode ser um método mais sensível para o isolamento do que culturas celulares (Downs, 1982; Lipton & Rohzon, 1986).

O TMEV pode ser cultivado em diferentes linhagens celulares, mas a linhagem BHK-21, proveniente de rim de hamster, tem sido a linhagem mais comumente utilizada para a propagação do vírus, para ensaios de titulação viral e soroneutralização (Lipton & Dal

Canto, 1979; Friedmann & Lipton, 1980). O efeito citopático produzido pela infecção por TMEV em células BHK-21 consiste em arredondamento celular e desprendimento da monocamada (Lipton & Rohzon, 1986).

O diagnóstico por TMEV também pode ser realizado por métodos moleculares conforme descrito por Zoll *et al.* (1993). Métodos moleculares (PCR e RT-PCR) têm sido empregados desde a década de 80 para a detecção e identificação de agentes infecciosos (vírus, parasitas e bactérias) em colônias de camundongos e ratos, em conjunto com métodos tradicionais de sorodiagnóstico. As vantagens do PCR são sua alta sensibilidade e especificidade, o que permite a diferenciação de microorganismos relacionados. Embora a técnica venha sendo amplamente utilizada, resultados falso-positivos ou falso-negativos podem ocorrer, exigindo, portanto, cautela na sua interpretação. Outro fator importante e necessário na RT-PCR é o conhecimento da patogênese do agente infeccioso, o que contribui para a obtenção correta das amostras (Taylor & Copley, 1994; Feldman, 2001).

As características da infecção natural e experimental por TMEV em camundongos têm sido relatadas na literatura, enquanto que a infecção natural por TMEV-GDVII em ratos é questionável, com poucas descrições da presença deste vírus nestes animais. Em contrapartida, a prevalência de infecção por TMEV em colônias de ratos tem sido relatada por pesquisadores americanos e europeus, como descrito anteriormente (Descoteaux *et al.*, 1977; Jacoby & Lindsey, 1997; Zenner & Regnault, 2000). Da mesma forma, Gilioli (2003) demonstrou que a porcentagem de positividade para anticorpos anti-TMEV-GDVII em onze colônias de ratos analisadas variava entre 10% a 50%.

Diante dos resultados observados por Gilioli *et al.* (1996), Gilioli (2003) e por pesquisadores de outros países (Descoteaux *et al.*, 1977; Kraft & Meyer, 1990; Jacoby & Lindsey, 1997; Zenner & Regnault, 2000) quanto à infecção por TMEV em colônias de ratos, além das poucas referências encontradas na literatura, o presente trabalho teve como finalidade demonstrar a possibilidade de infecção natural por TMEV em colônias convencionais de ratos.

2. OBJETIVOS:

Considerando a existência de anticorpos anti-TMEV-GDVII em colônias de ratos mantidos em biotérios convencionais, os seguintes objetivos foram estabelecidos:

1. Detectar anticorpos anti-TMEV-GDVII em colônias convencionais de ratos pela reação de imunofluorescência indireta;
2. Verificar a identidade de anticorpos anti-TMEV-GDVII em soros de ratos provenientes de colônias convencionais pelo ensaio de soroneutralização;
3. Isolar o TMEV de colônias de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, pela inoculação de suspensão intestinal destes animais em células BHK-21;
4. Caracterizar os sinais clínicos induzidos por TMEV após inoculação intracerebral em camundongos e ratos neonatos, com suspensão intestinal de ratos de colônia convencional;
5. Utilizar a técnica de RT-PCR, com *primers* específicos para o gênero *Cardiovirus*, para detectar RNA viral em amostras de fezes de ratos de diferentes biotérios com colônias convencionais, em amostras de suspensão intestinal e em amostras de cérebros de camundongos e ratos inoculados com material proveniente de ratos soropositivos para TMEV-GDVII.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Linhagem celular

A linhagem celular BHK-21 (Baby Hamster Kidney), proveniente de fibroblasto de rim de hamster, obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, foi utilizada para a propagação da amostra de TMEV-GDVII, para os ensaios de soroneutralização e para o isolamento de TMEV de suspensão intestinal e cerebral de ratos normais e infectados experimentalmente.

As células foram cultivadas em garrafas plásticas descartáveis de 75 cm² (Costar, USA) com 2×10^5 células/ml e mantidas em meio Mínimo Essencial de Eagle com sais de Earle (MEM - Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutricell) e 100UI/ml penicilina (Fontoura-Wieth), 100µg/ml estreptomicina (Sigma, USA), de acordo com a metodologia descrita por Freshney, 1993. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida e diariamente observadas em microscópio invertido (Reichert Jung, Bio Star).

3.2) Produção do antígeno viral

Para a produção do antígeno viral foi utilizada a amostra padrão TMEV-GDVII, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Volker Kraft do Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, Alemanha.

Monocamadas confluentes de células BHK-21 foram inoculadas com 1,0ml da suspensão do vírus e o inóculo foi mantido por 90 minutos a 37°C em atmosfera úmida. Após o período de adsorção, foram adicionados 15ml de MEM-Eagle, contendo 2% de SFB, 100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina e as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida por 24 horas. Após observação de efeito citopático (ECP) as células infectadas foram congeladas e descongeladas por três vezes, para a lise celular, e centrifugadas a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Beckman Instruments-JC-21, rotor JA14). Os sobrenadantes obtidos foram aliquotados em ampolas de criogenia (Corning, USA) e, em seguida, congelados em freezer a - 70°C até o momento do uso.

3.3) Determinação da dose infectante 50% em cultura de tecido (DICT_{50%})

Para determinar o título viral de cada passagem, seguiu-se o protocolo descrito por Hierholzer & Killington, 1996. Monocamadas confluentes de células BHK-21 foram tratadas com tripsina e ressuspensas em meio de cultivo contendo 10% SFB, 100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, de forma a conter 2×10^5 células/ml. Em placas de 24 orifícios (Costar, USA), foi adicionado 1,0ml da suspensão de células que foram mantidas em atmosfera úmida com 5% CO₂ a 37° C por 24 horas. Após lavagens com PBS 0,01M pH 7,2, foram adicionados 200µl de amostras das diferentes passagens, testadas em quadruplicata, nas diluições 10⁻¹ a 10⁻¹⁰. Em seguida a reação foi incubada por uma hora em estufa com 5% CO₂, para adsorção. Seguido este período adicionou-se meio de cultivo com 2% SFB e 100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. Como controle negativo da reação foi utilizada monocamada de células BHK-21 não infectadas. As leituras de efeito citopático foram realizadas 24 horas após infecção e o título viral foi determinado de acordo com o método de Spearman (1908) e Karber (1931) (Hierholzer & Killington, 1996).

3.4) Purificação parcial do vírus TMEV-GDVII

Com o objetivo de produzir anticorpos policlonais contra a cepa padrão de TMEV-GDVII, o vírus foi parcialmente purificado em gradiente de sacarose, de acordo com o método descrito por Lipton & Friedmann (1980).

Sobrenadantes de células BHK-21 infectadas com TMEV-GDVII foram incubados com SDS 1% por 30 minutos a 24°C. O vírus foi sedimentado a 25.000 rpm por duas horas a 24°C em rotor SW41 (Beckman Instruments, L-8M). O precipitado foi ressuspensão em tampão PBS 0,01M pH 7,2 e submetido a um gradiente de sacarose preparado em tampão PBS 0,01M pH 7,2. Adicionou-se volumes de 5,0ml de solução de sacarose 15% e 30%, preparados a partir de uma solução de sacarose 66%. Na porção superior do gradiente foram adicionados 500µl do precipitado obtido anteriormente. Em seguida este material foi centrifugado a 25.000 rpm por 20 horas a 24°C em rotor SW41 (Beckman Instruments-L-8M), e o gradiente obtido

foi fracionado em alíquotas de 500µl e o precipitado foi ressuspensão em tampão PBS 0,01M pH 7,2. As frações e o precipitado foram dialisados em tampão PBS 0,01M pH 7,2 a 4°C durante 18 horas. Para confirmar a presença de partículas virais em amostras de sobrenadantes de células infectadas e nas amostras obtidas da semipurificação, foi realizada reação de hemaglutinação com hemáceas humanas tipo O a 0,75% em tampão PBS 0,01M pH 7,2 (Lipton & Friedmann, 1980 e Burleson *et al.*, 1992 a).

3.5) Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas das amostras obtidas da purificação em gradiente de sacarose foi realizada de acordo com o micrométodo descrito por Bradford (1976).

Em uma microplaca de 96 orifícios (Corning, USA) adicionou-se 20µl das amostras teste, em triplicata. Em seguida, foram adicionados 200µl do corante Coomassie-Blue G250 em cada orifício e as placas foram mantidas ao abrigo da luz por dois minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Beckman DU 65-Multiskan MS) a 590 nm e comparada com uma curva padrão (0,2 a 2,0 µg/µl) de soro albumina bovina (BSA).

3.6) Produção de soros policlonais anti-TMEV-GDVII em camundongos e ratos

A produção de soros anti-TMEV-GDVII foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL INFECTIONS OF LABORATORY RODENTS, 1978.

Grupos de dez camundongos SPF da linhagem BALB/c/Uni e oito ratos SPF WISTAR/Uni com 30 dias de idade foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP). Os animais foram mantidos em unidades isoladoras de PVC flexível tipo Trexler, no biotério do Departamento de Imunologia e Microbiologia, Instituto de Biologia, com água e ração esterilizadas em vapor úmido sob pressão à temperatura de 121°C por 30 minutos.

Camundongos BALB/c/Uni foram inoculados em intervalos de sete dias (1, 7 e 14 dias) pela via intra-peritoneal com 50ng/ml de TMEV-GDVII parcialmente purificado em gradiente de sacarose. Da mesma forma, ratos Wistar/Uni receberam duas inoculações, via subcutânea, com a mesma suspensão viral diluída em adjuvante completo de Freund no 1º dia, seguido de inoculação com adjuvante incompleto de Freund no 7º dia.

No 28º dia após inoculação, os camundongos e ratos foram sacrificados em câmara de CO₂ e o sangue foi coletado por punção cardíaca com a utilização de anticoagulante EDTA 10% na proporção de 20µl/ml de sangue total. O sangue foi centrifugado a 2.000 rpm por 15 minutos a 4º C (Beckman Instruments-JC-21, rotor JA14) e o plasma coletado foi inativado a 56º C por 30 minutos e armazenado a -20º C até o momento do uso.

3.7) Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada de acordo com o método descrito por Kraft & Meyer, 1986.

Foram obtidos vinte e dois soros de ratos provenientes de colônia convencional e dezoito soros de camundongos e ratos imunizados. Para cada soro foram realizadas diluições seriadas na razão dois (1:5 a 1:160) em tampão PBS. Foram adicionados 25µl de cada diluição nos orifícios e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após duas lavagem em PBS 0,01M pH 7,2 durante 10 minutos cada, foram adicionados 25µl do conjugado anti-espécie diluído a 1:640 em PBS/Azul de Evans (Merck) para os soros de camundongos (Carneiro anti IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Sigma, USA), e diluído a 1:60 para os soros de ratos (Carneiro anti IgG de rato marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), Sigma, USA). As lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Prosseguiu-se com novas lavagens em PBS e, em seguida, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro em solução de glicerina tamponada pH 8,5.

Para cada teste foram incluídos soros controle positivos, obtidos de camundongos e

ratos experimentalmente inoculados, e soros normais obtidos de camundongos certificados da linhagem BALB/c/Uni e de ratos da linhagem WISTAR/Uni, provenientes de colônia SPF do CEMIB/Unicamp, livres de anticorpos para TMEV-GDVII. Os soros controles foram diluídos a 1:20 em PBS 0,01M pH 7,2.

As leituras foram realizadas em microscópio de fluorescência de epi-iluminação (ZEISS – Standard 20, Alemanha), dotado de lâmpada de mercúrio HBO 50W para luz ultravioleta, filtros de excitação BG 38 e barreira 450 – 490 nm, com aumento final de 400x.

Os soros obtidos também foram testados para a presença de anticorpos específicos contra outros patógenos murinos como: Coronavírus do rato (RCV/SDAV), Adenovírus, Rotavírus, Reovírus tipo 3 (Reo-3), vírus da pneumonia do camundongo (PVM), vírus minuto do camundongo (MVM), vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV), vírus Sendai, Toolan H-1, vírus Kilhan do rato (KRV) e para as bactérias *Mycoplasma pulmonis* e *Clostridium piliforme*.

3.8) Reação de Soroneutralização

O ensaio de soroneutralização foi realizado de acordo com o método descrito por Burleson *et al.* (1992b), com o objetivo de verificar a atividade neutralizante dos vinte e dois soros de ratos provenientes colônia convencional frente ao TMEV-GDVII.

Em uma microplaca de 96 orifícios (Costar, USA) foram adicionados 50µl de MEM contendo 100UI/mL de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. Em seguida, soros-teste, previamente inativados a 56°C por 30 minutos e diluídos a 1:5 em tampão PBS 0,01M pH 7,2, foram adicionados em duplicata e diluídos à razão dois.

Foi preparada uma suspensão do vírus TMEV-GDVII diluída em MEM com 100UI/ml de Penicilina e 100µg/ml de Estreptomicina de forma a conter 100DICT_{50%}. Foram adicionados 50µl em cada orifício e as placas incubadas por 90 minutos a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, exceto nas primeiras diluições do soro, para verificar sua toxicidade.

Posteriormente, garrafas com monocamadas de células BHK-21 foram tratadas com tripsina e foi preparada uma suspensão contendo 3x10⁵ células/ml. Foram adicionados 100µl desta suspensão em cada orifício e a placa novamente incubada nas condições

descritas acima. Soros controle positivos, obtidos de ratos WISTAR/Uni experimentalmente inoculados com TMEV-GDVII, e soros normais obtidos de camundongos BALB/c/Uni e ratos WISTAR/Uni, provenientes de colônia SPF do CEMIB/Unicamp, foram incluídos em cada reação, além dos controles de célula e vírus.

As leituras foram realizadas em microscópio invertido (Reichert-Jung, BioStar) com 24 e 48 horas após infecção para determinar o título soroneutralizante.

3.9) Obtenção de material biológico de ratos provenientes de colônias convencionais

3.9.1) Obtenção de amostras de plasma

Amostras de plasma foram obtidas de vinte e dois ratos da linhagem WISTAR, com idades entre quatro e oito meses, provenientes de um biotério que mantém colônias de ratos convencionais. Inicialmente os ratos foram sacrificados em câmara de CO₂ e, em seguida, sangrados via punção cardíaca, com a utilização de solução de EDTA 10% na proporção de 20µl/ml de sangue total. O sangue obtido foi centrifugado a 2.000 rpm por 15 minutos a 4° C (JC-21 Beckman Instruments - Rotor JA20). O plasma coletado foi inativado pelo calor a 56°C por 30 minutos em banho-maria e posteriormente analisado pela reação de imunofluorescência indireta para a presença de anticorpos anti-TMEV-GDVII (Kraft & Meyer, 1986).

3.9.2) Obtenção de amostras de fezes

Quarenta e oito amostras de fezes foram obtidas de ratos da linhagem WISTAR, com idades entre 20 dias a 1 ano, provenientes de quatro biotérios diferentes que mantêm colônias convencionais. De cada amostra foi preparada uma suspensão fecal a 10% em tampão PBS 0,01M pH 7,2, que foi clarificada por centrifugação a 2.500 rpm por 20 minutos a 4°C (Beckman Instruments-JC-21, rotor JA20). Os sobrenadantes foram coletados para posterior extração do RNA viral.

3.9.3) Obtenção da suspensão intestinal

Foram obtidos dez ratos da linhagem WISTAR, com idades entre quatro e oito meses, provenientes de um biotério que mantém colônias de ratos convencionais, para o isolamento do TMEV em cultura de células, para inoculação “in vivo” em camundongos e ratos neonatos e para a reação de RT-PCR.

Os animais foram sacrificados por CO₂, sangrados por punção cardíaca e, em seguida, submetidos à necropsia para a coleta do intestino delgado.

O intestino delgado foi lavado com solução Salina Fazéka pH 7,2 e coletadas amostras do duodeno, jejuno e íleo para o preparo da suspensão intestinal a 20% em Salina Fazéka, de acordo com o método descrito por Olitsky (1940), com algumas modificações. Esta suspensão intestinal foi congelada e descongelada por três vezes e centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C (JC-21 Beckman Instruments, Rotor JA 14). O sobrenadante obtido foi misturado com partes iguais de clorofórmio, submetido à agitação em Vortex (Daigger Vortex Genie 2™) durante 5 minutos e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C (JC-21 Beckman Instruments - Rotor JA 20), para a retirada de lipídeos.

A fase aquosa e límpida foi filtrada em membrana de acetato de celulose de poro 0,22µm (Millipore, Bedford, MA) e aliqotada em ampolas de congelamento (Nunc, USA).

3.10) RAP-TEST

O teste de produção de anticorpos em ratos (RAP-TEST) foi realizado de acordo com De Souza & Smith, 1989. O objetivo deste teste foi verificar a possível presença de outros vírus murinos na suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII.

Doze ratos machos da linhagem WISTAR/Uni com 30 dias de idade, provenientes de colônia SPF do CEMIB/UNICAMP foram divididos em dois grupos testes e um grupo controle, contendo quatro animais cada grupo. Os animais foram mantidos em unidades isoladoras tipo Trexler de PVC flexível, no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp.

Um grupo teste foi inoculado com 0,45ml da suspensão intestinal diluída 1/10 em solução Salina Fazéka, via intra-peritoneal. O outro grupo teste foi inoculado com 0,05ml pela via intranasal. O grupo controle foi inoculado pela via intra-peritoneal com 0,45ml de solução Salina Fazéka e com 0,05ml pela via intranasal.

Os animais foram sangrados via punção cardíaca 30 dias após a inoculação e o sangue foi processado conforme descrito no item 3.6.

Os plasmas obtidos foram testados pela reação de imunofluorescência indireta para a presença de anticorpos específicos contra: Coronavírus do rato (RCV/SDAV), Adenovírus, Rotavírus, Reovirus tipo 3 (REO-3), vírus da pneumonia do camundongo (PVM), vírus minuto do camundongo (MVM), vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV), vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV-GDVII), vírus Sendai, *Mycoplasma pulmonis*, *Clostridium piliforme* e *Toxoplasma gondii*. A presença de anticorpos antivírus Toolan H-1 e vírus Kilhan do rato (KRV) foram testados pela reação de inibição de hemaglutinação, segundo método descrito por Parker *et al.* (1979), enquanto anticorpos específicos contra *Corynebacterium kutscheri* e *Bordetella bronchiseptica* foram testados pela reação de microaglutinação, segundo Suzuki *et al.*, 1986.

3.11) Inoculação da suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII em células BHK-21

Monocamada de células BHK-21 foi tratada com tripsina e ressuspensa em MEM contendo 10% de SFB e 100 UI/ml de penicilina e 100µg/ml estreptomicina, de forma a conter 2×10^5 células/ml.

Em placas de 24 orifícios (Costar, USA) foi adicionado 1,0ml da suspensão de células que foram mantidas por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após incubação, foram feitas lavagens com PBS 0,01M pH 7,2 e adicionados, em cada um dos orifícios, 200µl das suspensões intestinais obtidas de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, diluídas 1/10 em MEM com 100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina. As placas foram mantidas por 90 minutos nas mesmas condições descritas acima, para adsorção. Após este período,

adicionou-se meio de cultivo com 2% SFB e 100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina e as placas foram novamente mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂, a 37° C.

A observação de efeito citopático foi realizada 24 e 48 horas após inoculação. Após 48 horas, independente da presença de efeito citopático, as placas foram congeladas e descongeladas por 3 vezes e as células centrifugadas a 2.000 rpm por 30 minutos a 4° C (JC-21 Beckman-Instruments - Rotor JA14). O sobrenadante foi congelado a -20°C para realizar novas passagens em células e para posterior reações de RT-PCR.

3.12) Inoculação da suspensão intestinal e da cepa padrão TMEV-GDVII em camundongos e ratos neonatos.

A inoculação da suspensão intestinal e da cepa padrão TMEV-GDVII em camundongos e ratos neonatos foi realizada de acordo com o método descrito por Lipton & Rozhon (1986), com algumas modificações, visando isolar o TMEV. Os procedimentos adotados nesta etapa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Unicamp (Anexo 8.1).

Camundongos neonatos da linhagem BALB/c/Uni, com dois dias de idade, e ratos neonatos da linhagem WISTAR/ Uni com dois dias de idade, foram obtidos de colônias SPF do CEMIB/Unicamp e mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia.

Um grupo de cinco camundongos e cinco ratos neonatos foram inoculados pela via intracerebral com 0,03ml e 0,06ml, respectivamente, com apenas uma das amostras de suspensão intestinal de ratos soropositivos (diluída 1:10 em solução Salina Fazéka) que foi selecionada por apresentar baixos títulos de anticorpos. Os grupos controles, constituídos de cinco camundongos neonatos BALB/c/Uni e cinco ratos WISTAR/Uni neonatos, foram mantidos em salas separadas e foram inoculados pela via intracerebral com 0,03ml e 0,06ml de solução Salina Fazéka, respectivamente.

Para a propagação da cepa padrão, grupos com nove camundongos neonatos da

linhagem BALB/c/Uni e dez ratos neonatos da linhagem WISTAR/Uni, com dois dias de idade, foram inoculados com TMEV-GDVII (1:10.000 em solução Salina Fazéka), pela via intracerebral, com 0,03ml e 0,06ml, respectivamente. Da mesma forma, grupos de sete camundongos neonatos BALB/c/Uni e quatro ratos WISTAR/Uni neonatos foram selecionados como animais controle e foram inoculados com solução Salina Fazéka pela via intracerebral, com os mesmos volumes descritos acima.

Os animais foram diariamente observados para a presença de sinais clínicos. Quando do seu aparecimento, os animais foram sacrificados em câmara de anestesia de CO₂ e os cérebros assepticamente coletados e divididos em duas partes. Uma parte foi congelada em nitrogênio líquido para realizar reações de RT-PCR, enquanto que a outra foi utilizada para preparar uma suspensão cerebral a 10% em Salina Fazéka, para passagens em células BHK-21.

A suspensão cerebral foi congelada e descongelada por três vezes e centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C (JC-21 Beckman Instruments - Rotor JA14).

As amostras de cérebro de camundongos e ratos do grupo controle também foram coletadas e utilizadas como controle normal nas reações de RT-PCR.

3.13) Inoculação de suspensão cerebral em células BHK-21

A inoculação da suspensão cerebral em células BHK-21 foi realizada como descrito no item 3.11.

3.14) Extração do RNA viral

A extração do RNA total foi realizada com a utilização de TRIzol LS (10296-010, Invitrogen Life Technologies), conforme técnica descrita pelo fabricante. O protocolo foi aplicado para amostras de sobrenadantes de células BHK-21 infectadas com TMEV-GDVII e EMCV, cérebros de camundongos e ratos normais e infectados, suspensões intestinais de ratos soropositivos para TMEV-GDVII e suspensão fecal de ratos de colônias convencionais.

Após descongelamento, 50mg das amostras de cérebro de camundongos e ratos normais e inoculados foram macerados em nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizadas com 1,0ml de TRIzol e 12,5µl de glicogênio (10814-010, Invitrogen Life Technologies).

Para as amostras de sobrenadantes de células infectadas, suspensões intestinais e suspensão fecal foram adicionados 900µl de TRIzol para cada 300µl da amostra. Esta mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e a ela foram adicionados 200µl de clorofórmio, incubando-se por mais 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C (Eppendorf 5402), para coleta da fase aquosa.

O RNA precipitado foi incubado com isopropanol gelado (v:v) por 10 minutos e, em seguida, submetido à centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C (Eppendorf 5402). O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1,0ml de etanol 75%, preparado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Gibco BRL). Após agitação em vortex (Daigger Vortex Genie 2™) por 15 segundos, o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C (Eppendorf 5402). Em seguida, o RNA foi ressuspense em 30µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Gibco BRL) e aquecido por 55°C por 10 minutos.

3.15) Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR)

O protocolo de RT-PCR foi realizado de acordo com o método descrito por Pritchard *et al.*, 1992.

As amostras de sobrenadantes de células BHK-21, infectadas com TMEV-GDVII e EMCV, cérebros de camundongos e ratos normais e infectados, suspensões intestinais de ratos soropositivos para TMEV-GDVII e suspensão fecal de ratos de colônias convencionais foram testadas com o par de *primers* designado como P1 (5'-CGAAGCCGCTTGGGAATA-3') e P2 (5'-CACGTGGCTTTTGGCCGCAGAGG-3'), específicos para a região conservada do genoma viral, denominada elemento IRES. Estes *primers* foram sintetizados pela Invitrogen Life Technologies, de acordo com a seqüência publicada por Zoll *et al.*, 1993. O quadro 1 demonstra a localização dos *primers* selecionados para reação de RT-PCR.

Para a síntese do cDNA foi utilizado *primer 2* na concentração de 125 pmoles,

0,5mM de dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e 10µl do RNA previamente extraído. Esta reação foi incubada por 65°C por 5 minutos e em seguida imersa em banho de gelo. Foram adicionados 10 mM de DTT, tampão para a primeira amplificação - 5x concentrado (“first-strand”) contendo 50mM Tris-HCl pH 8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂ e 100U da enzima M-MuLV (vírus da leucemia murina de Moloney) (Invitrogen Life Technologies) em um volume de reação de 20µl. A reação de transcrição foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (PerkinElmer) por 1 hora a 37°C e logo após a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 5,0µl do cDNA sintetizado à reação de amplificação, que continha tampão de reação (20mM Tris-HCl (pH 8,4) e 50mM KCl), 0,5mM dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 80 pmoles do *primer 1* e *primer 2* e 2,5U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Gibco BRL) para completar um volume final de reação de 50µl. Em seguida, no mesmo termociclador, as amostras foram denaturadas a 94°C por 5 minutos e submetidas a 30 ciclos de amplificação: 94°C por 2 minutos, 63°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto. A extensão ocorreu a 72°C por 7 minutos. Controles positivos e negativos foram incluídos, sendo que como controle negativo da reação foi utilizada água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Gibco BRL), juntamente com os mesmos reagentes utilizados para as amostras-teste. Como controle positivo foram utilizados os padrões de TMEV e EMCV obtidos de sobrenadantes de células BHK-21 infectadas.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato 2,0M e 0,5M EDTA), juntamente com marcador de peso molecular de DNA com 100pb (Invitrogen Life Technologies). A corrida eletroforética foi realizada a 80V por 70 minutos em cuba horizontal. Os amplificados foram contrastados por impregnação com Brometo de Etídio (0,5µg/µl) por 15 minutos. As bandas obtidas foram visualizadas em transiluminador de ultravioleta (Pharmacia LKB MicroVue) e logo em seguida fotodocumentadas (Image Master VDS, Pharmacia Biotech).

Quadro 1: *Primers* selecionados para a reação de RT-PCR para a identificação de *Cardiovirus* (TMEV e EMCV).

<i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos	Posição		Região codificante
		TMEV	EMCV	
P1	5'-CGAAGCCGCTTGGAATA-3'	529-	291-	IRES
		545	307	
P2	5'-	790-	552-	
	CACGTGGCTTTTGGCCGCAGAGG-	812	575	
	3'			

* Zoll *et al.*, 1993.

4) RESULTADOS

4.1) Determinação da dose infectante 50% em cultura de tecido (DICT_{50%})

A produção do antígeno viral foi realizada com a cepa padrão do vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV-GDVII) em células BHK-21.

O efeito citopático (ECP) foi observado entre 24 e 48 horas após a infecção, caracterizado por arredondamento celular e, na maioria das vezes, com desprendimento da monocamada de células (Figura 3). Células BHK-21 não infectadas foram mantidas como controle (Figura 2). Foram realizadas três passagens em células BHK-21 e o título viral foi determinado pelo método de Spearman (1908) e Karber (1931) (Hierholzer & Killington, 1996). Os títulos virais infectantes obtidos foram $10^{-5,1}$, $10^{-5,25}$ e $10^{-5,75}$.

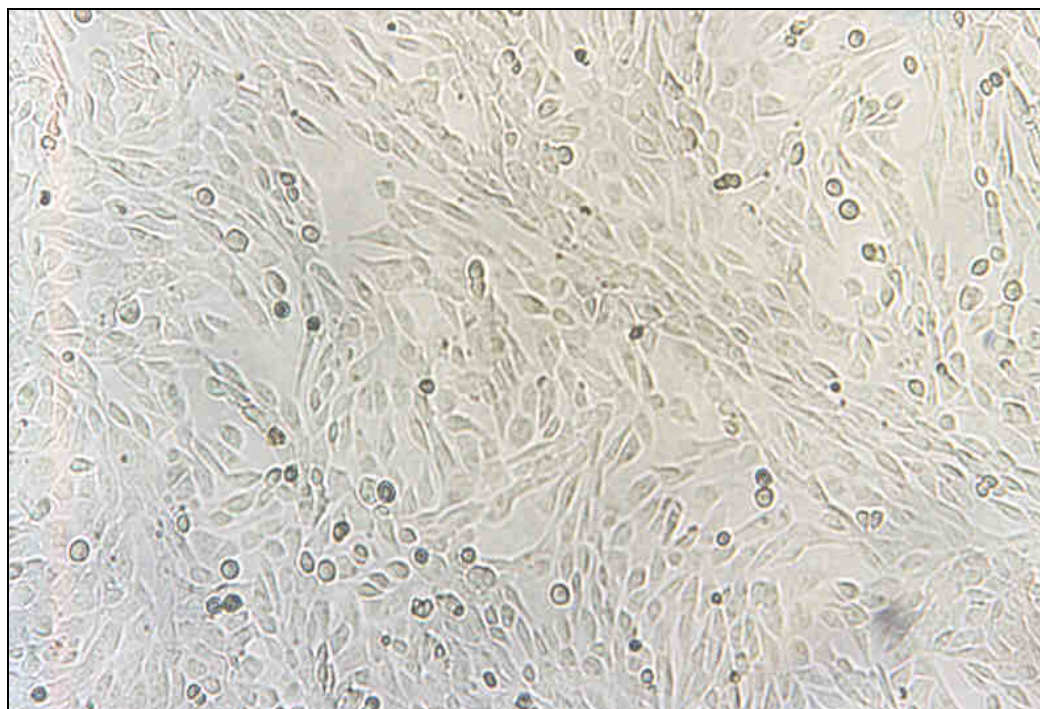


Figura 2: Monocamada de células BHK-21 (100x).

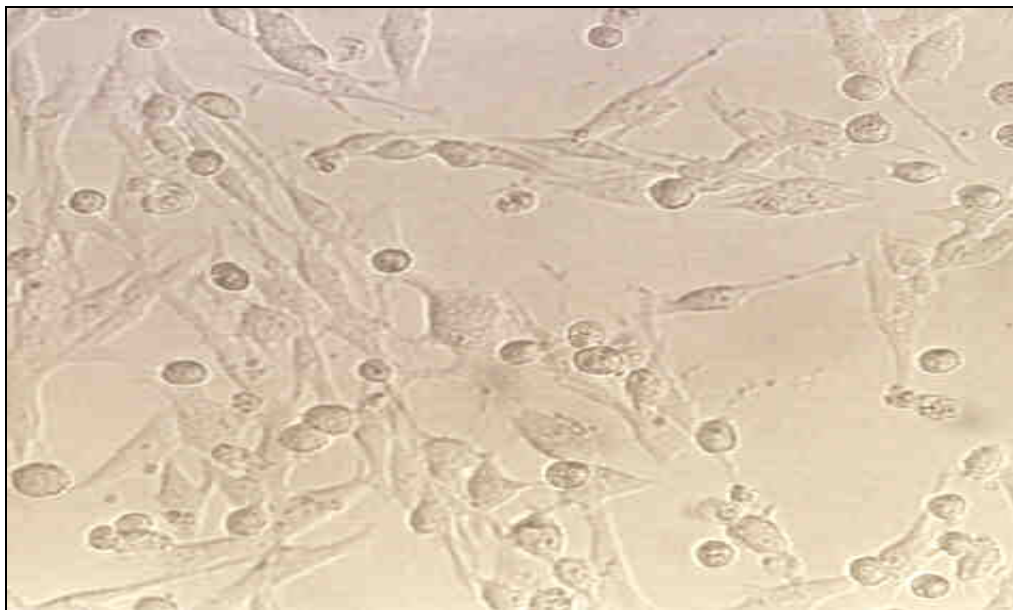


Figura 3: Efeito citopático após 24 horas de infecção com TMEV-GDVII em monocamada de células BHK-21 (200x).

4.2) Concentração de partículas virais em gradiente de sacarose

Sobrenadantes de células BHK-21 infectadas com TMEV-GDVII foram semipurificadas em gradiente de sacarose 15% e 30%, conforme descrito no item 3.4, para posterior produção de soros policlonais anti-TMEV-GDVII. A presença de partículas virais nas alíquotas de sobrenadantes de células infectadas e nas frações e sedimentos obtidos da semipurificação foi verificada pela reação de hemaglutinação.

Os sobrenadantes de células infectadas apresentaram título hemaglutinante entre as diluições 1:8.192 e 1:32.768. Os títulos hemaglutinantes dos sedimentos obtidos após a concentração variaram entre 1: 16.384 e 1: 512.000.

4.3) *Imunofluorescência Indireta*

A reação de imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada com o objetivo de determinar a reatividade dos soros de ratos provenientes de colônia convencional e de camundongos e ratos imunizados frente ao TMEV-GDVII.

Os soros de camundongos imunizados apresentaram títulos de 1:20 até 1:80 e dos oito soros de ratos imunizados apenas seis apresentaram títulos de 1:20 até 1:80, conforme demonstrado no quadro 2.

Dos vinte e dois soros de ratos obtidos de colônia convencional, dezenove demonstraram títulos de anticorpos de 1:10 e 1:80.

Todos os soros também foram analisados para a presença de anticorpos específicos contra outros patógenos e, dentre os vinte e dois soros, apenas dez apresentaram-se positivos para *Mycoplasma pulmonis* e *Corynebacterium kutscheri*. Todas as outras amostras de soro apresentaram-se negativas para os antígenos já listados no item 3.10.

A figura 4 mostra a reação de imunofluorescência indireta para TMEV-GDVII, caracterizada por fluorescência citoplasmática em células BHK-21.

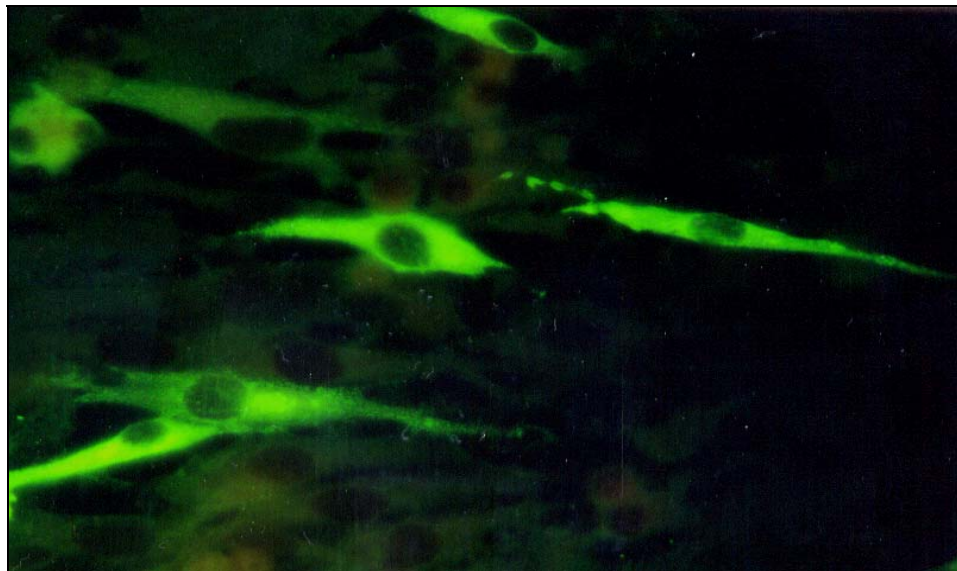


Figura 4. Imunofluorescência Indireta - Células BHK-21 infectadas por TMEV-GDVII (400x).

Quadro 2: Títulos de anticorpos obtidos pela reação de imunofluorescência indireta em soros de camundongos e ratos imunizados com TMEV-GDVII.

		Título de anticorpos anti-TMEV-GDVII									
TMEV-GDVII	Cam.	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5
		40	80	40	40	80	40	40	20	40	80
	Rato	1.1	1.2	1.3	1.4	2.1	2.2	2.3	2.4		
		Neg.*	20	40	Neg.*	20	80	40	40		

* Negativo

4.4) Ensaio de Soroneutralização

Foram testados vinte e dois soros de ratos naturalmente infectados, obtidos de colônia convencional, sendo que dezessete (77,2%) apresentaram anticorpos neutralizantes para TMEV-GDVII, com títulos de 1:20 até 1:320.

4.5) Teste da produção de anticorpos em ratos (RAP-TEST)

O teste da produção de anticorpos em ratos (RAP-TEST) foi utilizado como um método indireto para avaliar a resposta imune dos animais, frente à contaminação por possíveis agentes infecciosos na amostra de suspensão intestinal utilizada para as inoculações.

Os resultados obtidos para o grupo dos animais inoculados pela via intraperitoneal e via intranasal apresentaram-se negativos para TMEV-GDVII e para todos os agentes infecciosos pesquisados pela reação de imunofluorescência indireta, IHA e MA.

4.6) Isolamento do vírus TMEV

4.6.1) Em cultura de células

Foram realizadas nove passagens sucessivas em células BHK-21, de cada uma das dez amostras de suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII. Após 24 e 48 horas da inoculação não foi possível observar alterações celulares sugestivas de efeito citopático característico de TMEV-GDVII.

4.6.2) Em camundongos e ratos neonatos

Foram realizadas duas inoculações consecutivas em camundongos e ratos, pela via intracerebral, com uma das amostras de suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, que apresentou baixos títulos de anticorpos. Os animais foram observados por um período de 10 dias e os sinais clínicos observados estão descritos nos quadros abaixo.

Quadro 3: Caracterização dos sinais clínicos em camundongos neonatos BALB/c/Uni, após inoculação intracerebral com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII - 1ª e 2ª passagens.

PRIMEIRA PASSAGEM		
Nº de animais inoculados	Dia após inoculação	Sinais clínicos
05	1º	Início de paralisia em uma das patas posteriores e tremor.
	2º	Paralisia das duas patas posteriores, tremor, perda de peso e ausência de movimentação.
	3º	Morte de todos os animais inoculados.
SEGUNDA PASSAGEM		
Nº de animais inoculados	Dia após inoculação	Sinais clínicos
05	1º	Animais normais.
	2º	Paralisia de uma das patas posteriores, tremor e morte de apenas dois animais.
	8º	Paralisia das duas patas posteriores e perda de peso.
	10º	Morte dos animais inoculados.

Quadro 4: Caracterização dos sinais clínicos em ratos neonatos WISTAR/Uni, após inoculação intracerebral com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII - 1ª e 2ª passagens.

PRIMEIRA PASSAGEM		
Nº de animais inoculados	Dia após inoculação	Sinais clínicos
05	1º	Animais normais.
	2º	Início de paralisia de uma das patas posteriores e animais com pouca movimentação.
	3º	Paralisia das duas patas posteriores e tremor.
	10º	Paralisia das patas posteriores e sobrevivência de todos os animais.
SEGUNDA PASSAGEM		
Nº de animais inoculados	Dia após inoculação	Sinais clínicos
05	1º e 2º	Animais normais.
	3º	Início de paralisia de uma das patas posteriores.
	10º	Paralisia das duas patas posteriores e sobrevivência de todos os animais.

Durante a primeira passagem da suspensão intestinal em camundongos, os sintomas clínicos foram caracterizados por paralisia das patas posteriores, tremor, ausência de movimentação e perda de peso que foram observados no 1º e 2º dia após a inoculação. No 3º dia todos os animais inoculados morreram. Na segunda passagem, foram observados os mesmos sinais clínicos a partir do 2º dia após inoculação e os animais morreram no 10º dia.

Um quadro de infecção diferente foi observado em ratos WISTAR. Na primeira e na segunda passagem os animais apresentaram sinais clínicos semelhantes aos camundongos, caracterizados por paralisia, pouca movimentação e tremor com persistência destes sintomas até o 10º dia após inoculação. Na primeira passagem também foi observada uma rarefação de pêlos, como demonstrado na figura 9.

As figuras 5 a 11 mostram os animais em teste inoculados com a suspensão intestinal de ratos soropositivos e com a cepa padrão TMEV-GDVII.



Figura 5: À esquerda: Camundongo neonato BALB/c/Uni (3 dias de idade), inoculado com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, com perda de peso e paralisia (2º dpi).
À direita: Camundongo BALB/c/Uni normal com 3 dias idade.



Figura 6: Camundongo neonato BALB/c/Uni, (3 dias de idade), inoculado com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII. Paralisia e perda de peso (2º dpi).



Figura 7: Camundongo neonato BALB/c/Uni inoculado com a cepa padrão TMEV-GDVII. Paralisia das patas e perda de peso (4^o dpi).



Figura 8: Rato WISTAR/Uni normal com 11 dias de idade.



Figura 9: Rato WISTAR/Uni (11 dias de idade) inoculado com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII. Pêlos arrepiados e paralisia das patas posteriores (9^o dpi).



Figura 10: Rato WISTAR/Uni normal com 5 dias de idade.



Figura 11: Rato Wistar/Uni (4 dias idade) inoculado com a cepa padrão TMEV-GDVII. Perda de peso e paralisia das patas posteriores (2^o dpi).

4.7) Inoculação da suspensão cerebral em células BHK-21

Amostras de cérebro de camundongos e ratos que apresentaram sinais clínicos foram utilizadas para preparar uma suspensão cerebral a 10%, e posteriormente foram inoculadas em células BHK-21 para o isolamento do vírus a partir de amostras de cérebro de animais com sinais clínicos.

Foram realizadas quatro passagens sucessivas, com as amostras testadas em duplicata. As células foram observadas por 24 e 48 horas após inoculação. Na 4^a passagem foram observadas alterações celulares sugestivas de efeito citopático, caracterizadas por arredondamento e morte celular. Para confirmação da presença de partículas virais por RT-PCR, os sobrenadantes foram coletados, congelados e descongelados por três vezes.

4.8) Inoculação da cepa padrão TMEV-GDVII em camundongos e ratos neonatos

Foi realizada apenas uma inoculação em camundongos e ratos neonatos, pela via intracerebral, com a cepa padrão de TMEV-GDVII, utilizando o método descrito no item 3.12.

Os animais foram diariamente observados para a presença de sinais clínicos e, quando aparente, os cérebros foram coletados de forma asséptica e congelados em nitrogênio líquido para as reações de RT-PCR. Os sinais clínicos observados estão descritos nos quadros 5 e 6.

Quadro 5: Sinais clínicos em camundongos neonatos BALB/c/Uni inoculados com a cepa padrão TMEV-GDVII.

Nº de animais inoculados	Dia após inoculação	Nº de animais mortos	Nº de animais c/ sintomas	Sinais clínicos
09	1º	0	0	
	2º	0	0	
	3º	1	0	
	4º	02	07	Início de quadro de paralisia flácida e tremor.
	5º	04	03	Paralisia flácida das duas patas posteriores e perda de peso.

Quadro 6: Sinais clínicos em ratos neonatos WISTAR/Uni inoculados com a cepa padrão TMEV-GDVII.

Nº de animais inoculados	Dia após inoculação	Nº de animais mortos	Nº de animais c/ sintomas	Sinais clínicos
10	1º	0	0	
	2º	0	10	Início de paralisia das patas posteriores.
	3º	0	10	Paralisia das duas patas posteriores, perda de peso e debilidade em todos os animais.
	4º	10		Todos os animais mortos.

4.9) Reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR)

Os testes iniciais de RT-PCR tiveram por objetivo a padronização dos *primers* 1 (P1) e 2 (P2) tanto para os padrões TMEV-GDVII quanto para EMCV, uma vez que este *primer* é direcionado para uma região altamente conservada dentre os *Cardiovirus*.

Inicialmente foi realizada uma RT-PCR para a padronização da concentração ideal dos *primers* 1 e 2 para TMEV-GDII e EMCV e o resultado obtido foi um produto amplificado de 283 pares de base (pb) e 284 pares de base (pb), respectivamente (Figuras 12 e 13), sendo que a concentração de 540 nM foi a melhor concentração de uso para ambos os padrões. O resultado obtido para a padronização da temperatura de anelamento foi a de 63° C.

Em noventa e seis amostras analisadas com os *primers* 1 e 2, foi possível detectar doze amostras positivas, as quais apresentaram bandas com tamanho entre 283 pb e 284 pb, quando comparadas com os padrões TMEV-GDVII e EMCV.

Os resultados obtidos com o par de *primers* 1 e 2 estão colocados nas tabelas 1 a 4.

Tabela 1: Amostras de cérebros de camundongos testadas pela reação RT-PCR com *primers* P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.

Amostras de cérebros de camundongos	(Nº de positivos/Nº de amostras testadas).
Inoculados com SI de ratos soropositivos	0/2
Inoculados com SC de ratos com sinais clínicos	0/2
Inoculados com TMEV-GDVII	1/3
Grupo controle	0/3

SI: Suspensão intestinal

SC: Suspensão cerebral

Tabela 2: Amostras de cérebros de ratos testadas pela reação RT-PCR com *primers* P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.

Amostras de cérebros de ratos	(Nº de positivos/Nº de amostras testadas)
Inoculados com SI de ratos soropositivos	2/7
Inoculados com SC de ratos com sinais clínicos	1/1
Inoculados com TMEV-GDVII	2/4
Grupo controle	0/5

SI: Suspensão intestinal
SC: Suspensão cerebral

Tabela 3: Amostras de sobrenadantes de células testadas pela reação RT-PCR com *primers* P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.

Amostras de sobrenadantes de células BHK-21	(Nº de positivos/Nº de amostras testadas)
Infectadas com SC de camundongo do grupo controle	0/1
Infectadas com SC de camundongos inoculados com SI	0/5
Infectadas com SC de rato do grupo controle	0/1
Infectadas com SC de ratos inoculados com SI	0/4

SI: Suspensão intestinal
SC: Suspensão cerebral

Tabela 4: Amostras de suspensão fecal e intestinal de ratos de diferentes biotérios convencionais testadas pela reação RT-PCR com *primers* P1 e P2 para TMEV-GDVII e EMCV.

Amostras de suspensão intestinal e fecal	(Nº de positivos/Nº de amostras testadas)
SI de ratos soropositivos para TMEV-GDVII	0/10
SF de ratos de biotério convencional A	1/13
SF de ratos de biotério convencional B	1/9
SF de ratos de biotério convencional C	0/8
SF de ratos de biotério convencional D	4/18

SI: Suspensão intestinal
SF: Suspensão fecal

As figuras 12 a 17 mostram os resultados obtidos na RT-PCR para o par de *primers* P1 e P2, que amplificou algumas amostras de cérebro de ratos e camundongos e amostras de suspensão fecal, originando um fragmento com tamanho entre 283 pb (TMEV) e 284 pb (EMCV).

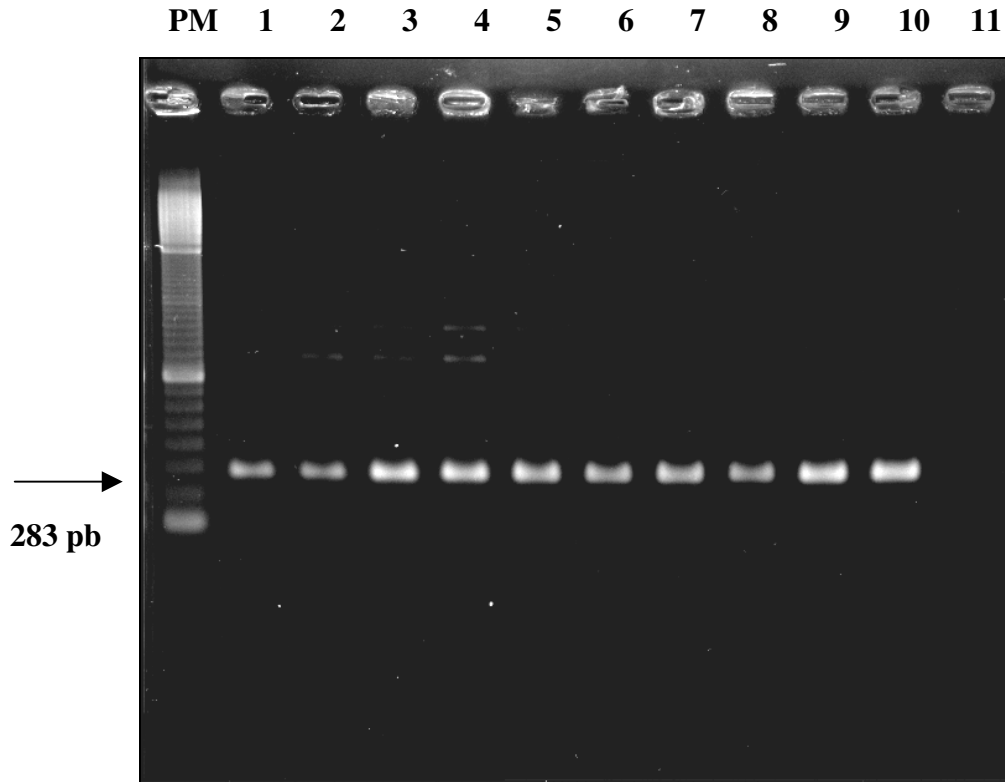


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Padronização da concentração de *primers* 1 e 2 para TMEV-GDVII. Produto amplificado de 283 pb obtido de sobrenadante de células BHK-21 infectadas com TMEV-GDVII. PM: padrão de peso molecular de DNA 100pb; colunas 1 e 2: concentração de *primer* 108 nM; colunas 3 e 4: concentração de *primer* 216 nM; colunas 5 e 6: concentração de *primer* 324 nM; colunas 7 e 8: concentração de *primer* 540 nM; colunas 9 e 10: concentração de *primer* 1080 nM; coluna 11: controle negativo (água tratada com DEPC).

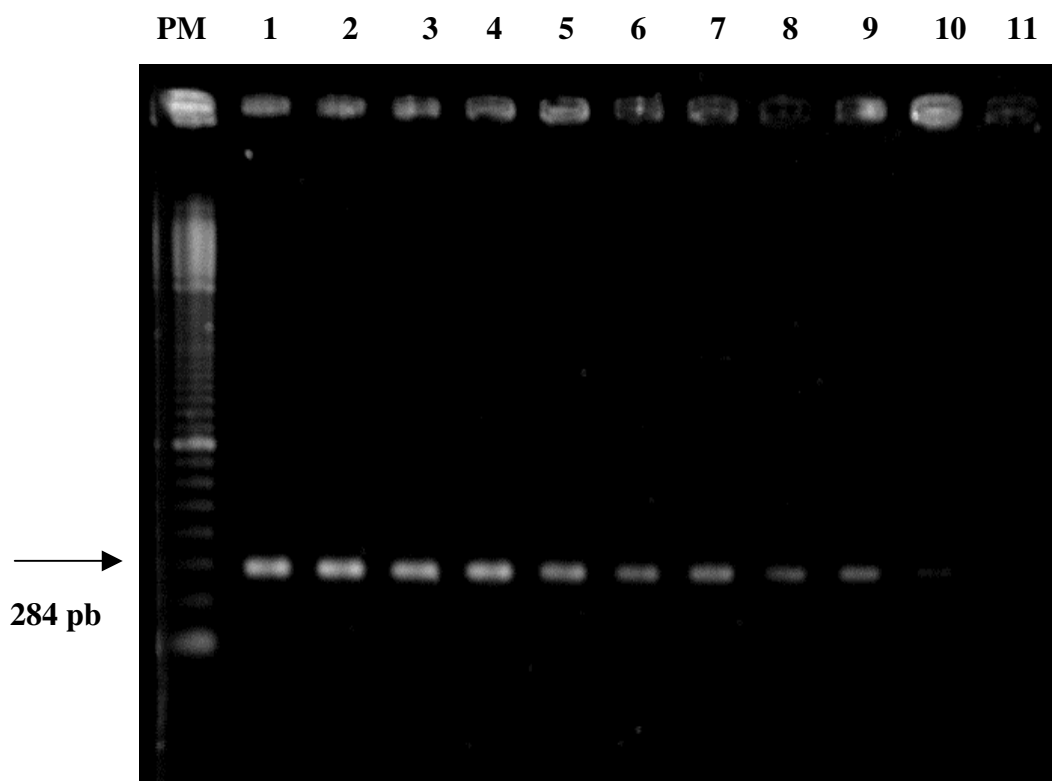


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Padronização da concentração de *primers* 1 e 2 para EMCV. Produto amplificado de 284 pb obtido de sobrenadante de células BHK-21 infectadas com EMCV. PM: padrão de peso molecular de DNA 100pb; colunas 1 e 2: concentração de *primer* 108 nM; colunas 3 e 4: concentração de *primer* 216 nM; colunas 5 e 6: concentração de *primer* 324 nM; colunas 7 e 8: concentração de *primer* 540 nM; colunas 9 e 10: concentração de *primer* 1080 nM; coluna 11: controle negativo (água tratada com DEPC).

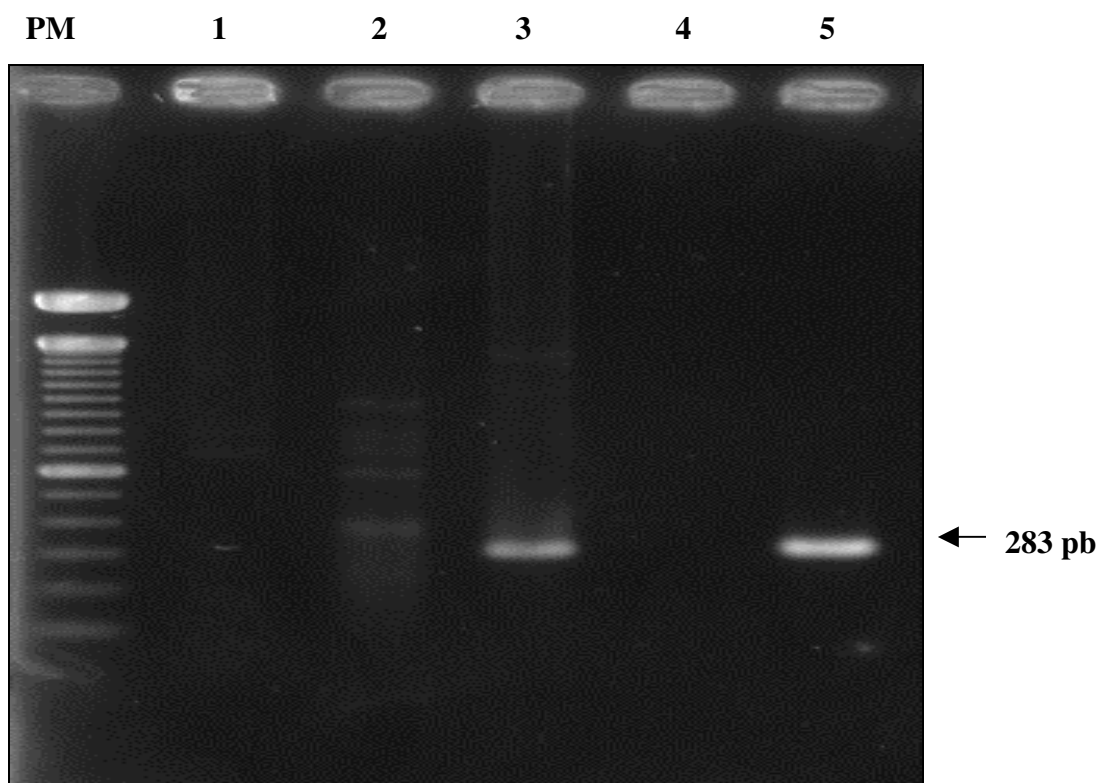


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produto amplificado com tamanho aproximado de 283 pb (TMEV) com *primers* 1 e 2 em amostras de cérebros de camundongos inoculados com suspensão intestinal e cepa padrão TMEV-GDVII. PM: Marcador de peso molecular de DNA 100 pb; coluna 1: amostra de cérebro de camundongo neonato normal; coluna 2: cérebro de camundongo inoculado com suspensão intestinal; coluna 3: cérebro de camundongo inoculado com cepa padrão TMEV-GDVII; coluna 4: controle negativo (água tratada com DEPC); coluna 9: controle positivo TMEV-GDVII.

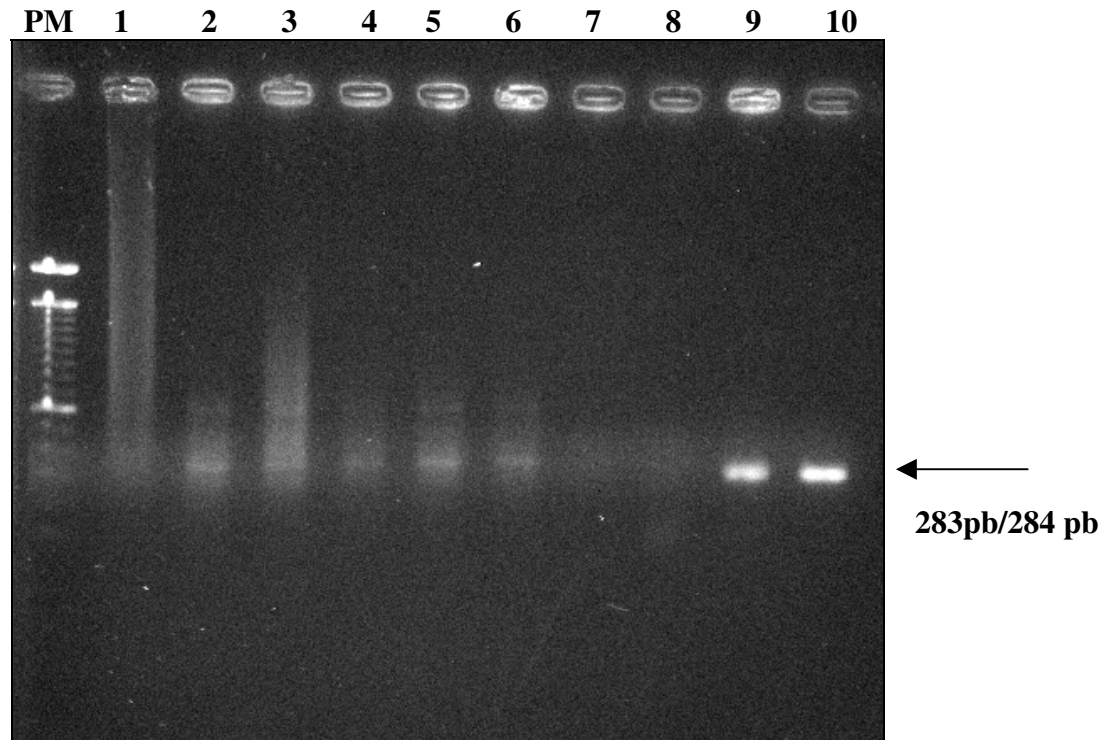


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produtos amplificados com tamanhos entre 283 pb e 284 pb obtidos com *primers* 1 e 2 em amostras de cérebro de ratos normais e inoculados com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII e com a cepa padrão. PM: Padrão de peso molecular de DNA 100 pb; coluna 1: cérebro de rato normal (11 dias); colunas 2 e 3: amostras de cérebro de ratos inoculado com suspensão intestinal (11^o dpi); coluna 4: cérebro de rato inoculado com suspensão cerebral de ratos com sintomas; colunas 5 e 6: amostras de cérebro de ratos inoculados com cepa padrão TMEV-GDVII; colunas 7 e 8: controle negativo (água tratada com DEPC); coluna 9: controle positivo TMEV-GDVII; coluna 10: controle positivo EMCV.

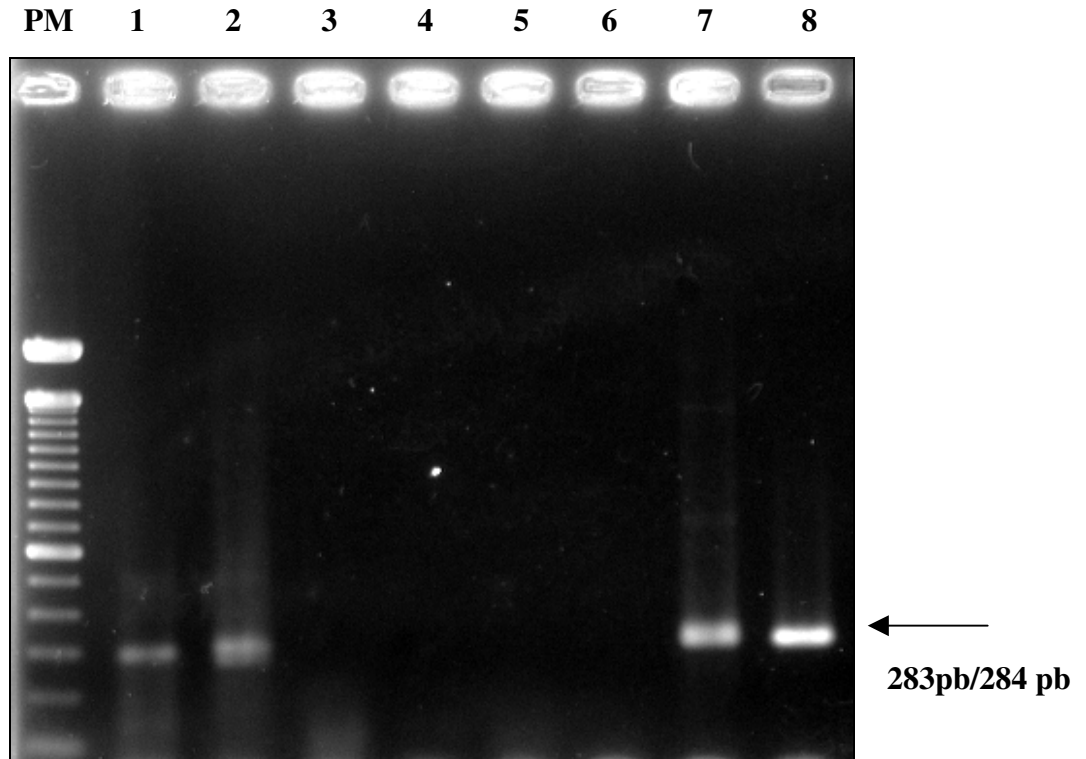


Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produto amplificado com tamanho entre 283 pb e 284 pb obtidos com *primers* 1 e 2 em amostras de fezes de ratos provenientes de diferentes colônias convencionais. PM: Marcador de peso molecular de DNA 100 pb; coluna 1: fezes de rato com 30 dias (Biotério A); coluna 2: fezes de rato com 40 dias (Biotério B); coluna 3: fezes de rato com 56 dias; coluna 4: fezes de rato com 59 dias; coluna 5: fezes de rato com 81 dias; coluna 6: controle negativo (água tratada com DEPC); coluna 7: controle positivo TMEV-GDVII e coluna 8: controle positivo EMCV.

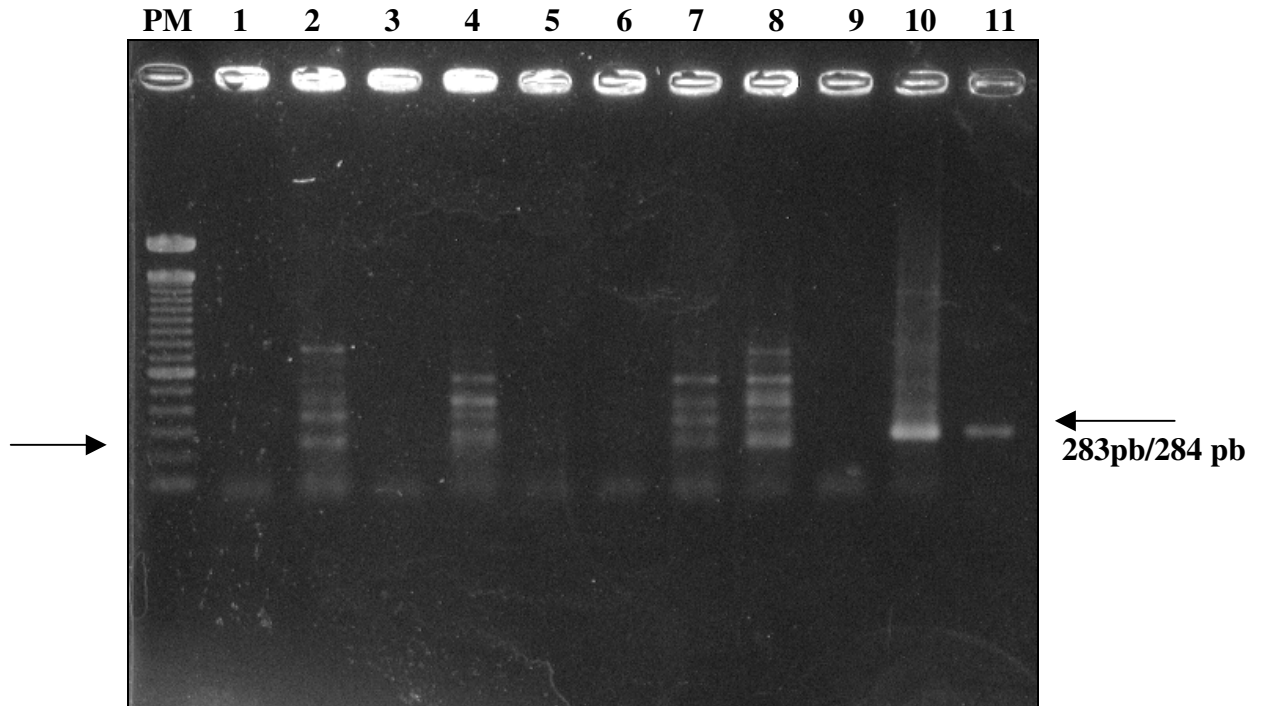


Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1,5%. Produto amplificado com tamanho entre 283 pb (TMEV) e 284 pb (EMCV) com *primers* 1 e 2 em amostras de fezes de ratos provenientes de uma colônia convencional (Biotério D). PM: Marcador de peso molecular de DNA 100 pb; coluna 1: controle negativo (água tratada com DEPC); coluna 2: fezes rato (56 dias); coluna 3: fezes rato (59 dias); coluna 4: fezes rato (59 dias); coluna 5 e 6: fezes rato (70 dias); coluna 7: fezes rato (81 dias); coluna 8: fezes rato (84 dias); coluna 9: fezes rato (94 dias); coluna 10: controle positivo TMEV-GDVII e coluna 11: controle positivo EMCV.

5. DISCUSSÃO

O estudo da doença induzida pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) foi de grande importância na pesquisa biomédica desde sua primeira descrição por Max Theiler em 1933. A doença induzida por TMEV em camundongos apresenta semelhanças do ponto de vista clínico com a poliomielite humana (Theiler & Gard, 1940b; Rueckert, 1996). Também a infecção experimental em camundongos é um valioso modelo para o estudo de doenças desmielinizantes induzidas por vírus (Lipton, 1975; Miller, 1992; Goverman & Brabb, 1996).

A infecção natural por TMEV em colônias de camundongos tem sido frequentemente relatada (Downs, 1982). A prevalência de infecção nas colônias convencionais de camundongos de biotérios brasileiros é alta, chegando a 70,6% (Gilioli, 2003), bem como em outros países (Descoteaux *et al.*, 1977; Jacoby & Lindsey, 1997; Zenner & Regnault, 2000).

Dados da literatura relatam a ocorrência de anticorpos anti-TMEV em roedores silvestres (*Mus musculus*), sugerindo, portanto, que esta espécie também poderia ser hospedeiro natural da infecção por TMEV (Lipton *et al.*, 2001).

A detecção de anticorpos anti-TMEV-GDVII tem sido demonstrada em colônias de ratos mantidos em biotérios brasileiros sem sistema de barreiras sanitárias, conforme um estudo realizado em 18 biotérios brasileiros por Gilioli *et al.*, 1996 e Gilioli (2003), que demonstrou que 54,5% das colônias de ratos apresentavam-se positivas. Resultados semelhantes foram obtidos por pesquisadores de outros países (Lussier & Descoteaux, 1986; Descoteaux *et al.* 1977; Jacoby & Lindsey, 1997; Zenner & Regnault, 2000). Por outro lado, dados sobre a infecção natural por TMEV em colônias convencionais de ratos são escassos e questionáveis.

McConnell *et al.* (1964) isolaram um agente transmissível, denominado MHG, de ratos adultos da linhagem Sprague-Dawley que demonstravam uma doença clínica caracterizada por rodopios, tremores e ausência de coordenação. Este agente apresentava propriedades físicas e biológicas similares ao TMEV e era capaz de produzir infecção fatal em ratos e camundongos jovens, quando inoculado intracerebralmente. O vírus foi isolado de órgãos como cérebro, pulmão e intestinos. Testes sorológicos, como fixação de complemento, soroneutralização

e resultados de histopatologia, demonstraram que o agente MHG era capaz de reagir com anticorpos produzidos em camundongos anti-TMEV-GDVII. Desta forma, havia indicações que o MHG poderia dividir antígenos comuns com o TMEV.

Hemelt *et al.* (1974), comparando o vírus MHG com TMEV, concluíram que o vírus MHG apresentava antígenos em comum com o TMEV pelo teste de fixação de complemento, embora apresentasse diferenças nos testes de soroneutralização e no quadro clínico induzido em neonatos e animais jovens.

Recentemente, Ohsawa *et al.* (2003) relataram o isolamento em ratos WISTAR de um vírus denominado vírus do rato Theiler-“like”. O estudo foi realizado quando um total de 2.578 soros de ratos foram testados pela reação de imunofluorescência indireta e 194 soros (7,5%) foram positivos para anticorpos anti-TMEV. O vírus foi isolado de suspensão cerebral de ratos neonatos inoculados intracerebralmente com suspensão intestinal de ratos sentinelas (que tinham soroconvertido após exposição a maravalha utilizada por ratos soropositivos para TMEV), sem doença clínica. O isolado foi denominado de NGS910. A análise por Western blotting revelou a relação antigênica de polipeptídeos de NGS910 com outras cepas de TMEV (MHG, GDVII e EMCV), uma vez que soros de ratos positivos na IFI reconheceram a VP0 do isolado NGS910, como também de GDVII e MHG. Estes resultados demonstraram que o isolado NGS910 poderia pertencer ao grupo TMEV, dentro do gênero *Cardiovirus* (Ohsawa *et al.*, 2003).

Para determinar o grupo ou subgrupo a que este vírus pertencia, a sequência completa do genoma de NGS910 foi determinada através de vários produtos de PCR e verificou-se que este apresentava 8021 nucleotídeos, similar ao genoma de outros TMEV que possuem entre 8093 a 8101 nucleotídeos. A análise filogenética da sequência de nucleotídeos da proteína L demonstrou que este isolado é mais próximo das cepas BeAn 8386, DA, GDVII, MHG e VHEV e pouco relacionado com EMCV. Portanto, dentro do grupo TMEV, o isolado NGS910 foi divergente de outros vírus pertencentes a este grupo. De acordo com seus resultados, Ohsawa *et al.* (2003) propuseram designar este isolado como um vírus de rato Theiler-“like”. A sequência do genoma deste isolado está depositada no banco de dados Gen Bank (AB090161).

Baseado nestes relatos, o presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade da infecção natural por TMEV em ratos, dada a prevalência de anticorpos anti-TMEV-GDVII nestes animais. Inicialmente, foram utilizados métodos sorológicos, como a imunofluorescência indireta, para a detecção de anticorpos anti-TMEV em animais mantidos em sistemas convencionais e a reação de soroneutralização para verificar a reatividade cruzada dos soros de ratos com TMEV-GDVII. Foram analisadas pela imunofluorescência indireta vinte e duas amostras de soros de ratos, de diferentes idades e sem histórico de doença clínica. Dos vinte e dois soros analisados, dezenove (86,3%) apresentaram anticorpos para TMEV-GDVII, com títulos de 1:10 até 1:80. Da mesma forma, as amostras de soro foram testadas para outros patógenos murinos, sendo que 10 amostras apresentaram positividade para *Mycoplasma pulmonis* e *Corynebacterium kutscheri*.

Diante deste resultado, poder-se-ia inferir que estes animais teriam sido infectados naturalmente pelo TMEV, ou por um outro vírus com semelhanças antigênicas com o TMEV. Os baixos títulos de anticorpos detectados pela IFI poderiam significar infecção anterior e a não persistência deste vírus nestes animais.

É interessante verificar que talvez a transmissão do TMEV, para uma outra espécie, neste caso, os ratos, tenha ocorrido por diversos fatores como: manutenção de camundongos e ratos em uma mesma sala, condições higiênico-sanitárias e técnicas de manejo inadequadas.

Por outro lado, orientações da Charles River Laboratories (<http://www.criver.com/techdocs/ratgd/html>), alertam que a IFI, apesar de ser uma técnica altamente sensível e específica, não seria conclusiva para determinar por um novo vírus de rato ou por outros vírus relacionados. Reações cruzadas decorrentes de epítomos semelhantes em vírus correlacionados podem levar a resultados positivos em IFI, bem como quando são adotadas outras reações de imunodiagnóstico.

Resultados de reatividade cruzada com TMEV-GDVII e MHG foram descritos por McConnell *et al.* (1964), com base em testes de fixação de complemento. Recentemente, Ohsawa *et al.* (2003) relatou que o vírus MHG também é um membro do grupo TMEV, com similaridades com o vírus Vilyuisk e com TMEV-GDVII, pela análise da seqüência da proteína L (ORF) do vírus MHG, que apresenta apenas a seqüência parcial de seu genoma depositada no Genbank.

Sendo assim, haveria a necessidade de escolher outras metodologias que poderiam ser mais conclusivas. Uma destas técnicas, seria a soroneutralização (Burlison *et al.*, 1992b; Cherneski, 1996).

Alguns trabalhos publicados por Nitayaphan *et al.* (1985a, b), demonstraram a utilização de anticorpos monoclonais neutralizantes como uma ferramenta para definir as diferenças entre as cepas de TMEV, além de determinar os epítomos virais importantes pelas atividades biológicas destas cepas “*in vivo*”. Os anticorpos monoclonais reagiram contra grupos específicos de TMEV, como também demonstraram a presença de sítios neutralizantes específicos em cada subgrupo, o que confirmou a divisão do TMEV em dois subgrupos que constituem as cepas altamente virulentas (GDVII e FA) e as pouco virulentas (BeAn, DA, WW) (Lipton, 1975).

Os vinte e dois soros, anteriormente testados pela imunofluorescência indireta, foram testados pelo ensaio de soroneutralização, frente ao vírus TMEV-GDVII em células BHK-21 e, dezessete deles (77,2%), apresentaram títulos de neutralização entre 1:20 e 1:320.

Para verificar a reatividade cruzada entre TMEV-GDVII e um possível TMEV presente em ratos, haveria então a necessidade do isolamento do vírus para a produção de anticorpos específicos que pudessem ser testados frente ao TMEV-GDVII e outros vírus relacionados pertencentes ao grupo *Cardiovirus*.

Visando, em um primeiro momento, o isolamento do agente viral, uma suspensão intestinal obtida de ratos soropositivos para TMEV-GDVII foi inoculada em células BHK-21, linhagem celular utilizada tanto para a propagação de TMEV-GDVII, quanto para o seu isolamento (Lipton & Rozhon, 1986). Após nove passagens sucessivas não foi possível observar a presença de efeito citopático característico da infecção por este grupo de vírus. Testes de RT-PCR, com *primers* específicos para regiões conservadas de vírus do gênero *Cardiovirus*, foram negativos para os sobrenadantes destas passagens celulares.

O não isolamento do vírus em células BHK-21 poderia ser decorrente de vários fatores. Um deles diz respeito à idade dos animais dos quais foram obtidas as suspensões intestinais. Por serem animais com idades entre quatro e oito meses, sua positividade para anticorpos anti-TMEV-GDVII pode significar infecção anterior. A literatura descreve que camundongos se infectam entre três e seis semanas de idade e o vírus pode ser detectado nas fezes destes

animais por até 53 dias (Theiler & Gard, 1940b; Olitsky, 1940). Ao mesmo tempo, sabe-se que a produção de imunoglobulinas tem um papel importante na expressão das infecções por TMEV, uma vez que atua efetivamente no “clearance” viral (Yamada *et al.*, 1991). Assim, mesmo que o animal esteja persistentemente infectado, a liberação de vírus infectivos pode ser baixa. Cash *et al.* (1985) relataram que durante a infecção persistente no sistema nervoso central, induzida por cepas com baixa virulência, baixas quantidades de partículas virais infecciosas e RNA viral podem ser detectadas, sugerindo uma expressão restrita do vírus. Pode-se inferir que quando da infecção no trato gastrointestinal, ou seja, com o vírus replicando-se em células epiteliais do intestino delgado, haveria também um baixo número de partículas virais sendo liberadas, além da presença de anticorpos do tipo IgA formados na mucosa intestinal (Lipton & Rozhon, 1986). Logo, vírus pouco infectivos, ou baixa concentração de viriões, explicariam a não adaptação do vírus ao sistema de isolamento “*in vitro*”.

Uma outra explicação para este não isolamento seria a linhagem celular utilizada, BHK-21, que neste caso poderia não ser permissiva para a multiplicação viral. Ohsawa *et al.* (2003) obtiveram resultados semelhantes ao inocular células BHK-21 com amostras de fezes recém coletadas e conteúdo intestinal de ratos sentinelas e de animais neonatos inoculados intracerebralmente. Os autores somente conseguiram efeito citopático típico de *Cardiovirus* em células BHK-21 com a suspensão cerebral de ratos inoculados após a quarta passagem. Testes de IFI confirmaram a presença de TMEV. De acordo com relatos anteriores, que descrevem a infecção persistente induzida pelas cepas de TMEV de baixa virulência, estes dados confirmam pela persistência do vírus em tecido nervoso (Lipton, 1975; Bureau *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1996; Luo, 1997; Jnaoui & Michielis, 1998).

Assim, buscou-se a adaptação deste vírus em sistemas “*in vivo*”. Para isso camundongos e ratos neonatos, provenientes de colônia SPF, foram inoculados pela via intracerebral com a mesma suspensão intestinal obtida de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, realizando-se apenas duas passagens. A utilização de animais neonatos para a propagação do vírus foi realizada, de acordo com recomendações da literatura, por ser um método mais sensível para o isolamento viral (Downs, 1982, Lipton & Rozhon, 1986). Da mesma forma, a escolha da via de inoculação baseou-se em dados que demonstram sua eficácia para a adequada adaptação de vários vírus entéricos (Downs, 1982, Lipton & Rozhon, 1986).

A presença de sintomas em camundongos foi observada nos primeiros dias após inoculação, com morte dos animais em torno do 3º dia na primeira passagem, e 10º dia na segunda passagem. A mortalidade observada apenas no 10º dia, na segunda passagem, sugere uma possível seleção de cepas menos virulentas pelos camundongos, em função da inoculação de material proveniente de ratos, ou seja, de um outro hospedeiro. Este fato poderia significar atenuação de cepa, dada as diferenças de hospedeiros (Lipton *et al.*, 1991).

Os sinais clínicos observados em camundongos foram caracterizados por paralisia das patas posteriores, tremores, perda de peso e morte, o que é sugestivo da infecção por TMEV. Estes resultados foram semelhantes àqueles obtidos quando da inoculação de camundongos, via intracerebral, com a cepa padrão de TMEV-GDVII. Neste caso os sinais característicos foram: paralisia flácida das patas posteriores, tremor e perda de peso. O aparecimento destes sintomas ocorreu no 4º dia após inoculação, o que está de acordo com dados da literatura (Theiler, 1937; Lipton, 1975; Downs, 1982; Lipton & Rohzon, 1986). Cepas classificadas como neurovirulentas (GDVII e FA) induzem encefalite severa e morte em animais neonatos, entre quatro a cinco dias após inoculação intracerebral (Theiler & Gard, 1940a; Lorch *et al.*, 1981; Lipton & Rohzon, 1986). Quando animais adultos são inoculados pelas vias intracerebral e intranasal, o aparecimento destes sintomas é dependente da dose de vírus (Theiler & Gard, 1940b; Downs, 1982).

Após a inoculação da suspensão intestinal em ratos neonatos, o que pode ser observado foi a presença de sintomas em torno do 2º e 3º dias após inoculação, tanto na primeira quanto na segunda passagem, com os animais sobrevivendo até o 10º dia, ainda com sintomas. Os sinais clínicos foram os mesmos descritos para os camundongos, porém, somente quando da primeira passagem, acrescidos de uma rarefação de pêlos quando comparados com os animais do grupo controle.

Estes resultados sugeriam pela possível infecção por TMEV em ratos, dada as similaridades de sinais clínicos evidenciados por nós e aqueles descritos na literatura quando da infecção por TMEV-GDVII em camundongos (Theiler, 1937; Downs, 1982; Lipton & Rohzon, 1986). McConnell *et al.* (1964) isolaram o vírus MHG de ratos que apresentavam estes mesmos sintomas. Por outro lado, Ohsawa *et al.* (2003) descreveram que quando ratos e camundongos

neonatos foram inoculados intracerebralmente com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV, não obtiveram sinais clínicos que sugerissem infecção por TMEV ou vírus relacionados.

Para a comparação de que sintomas observados fossem decorrentes de infecção por TMEV, ratos neonatos SPF foram inoculados, pela via intracerebral, com a cepa padrão TMEV-GDVII. Com este procedimento poderia também ser verificada a propagação deste vírus nestes animais. Neste caso, o aparecimento de sinais clínicos ocorreu no 2º e 3º dia após a inoculação e foram caracterizados por paralisia flácida das patas posteriores, tremores, perda de peso e debilidade, portanto semelhantes àqueles observados nos ratos inoculados com a suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, quanto em camundongos também inoculados. No entanto, diferentemente do relatado acima, os animais morreram no 4º dia após inoculação. A explicação para este fato seria que os sinais clínicos observados nos ratos inoculados com a suspensão intestinal poderiam ser decorrentes de uma infecção por TMEV, porém, com virulência já alterada para estes hospedeiros (Zurbriggen *et al.*, 1989, Calenoff *et al.*, 1990, Michiels *et al.*, 1995, Denis & Koenen, 2003). Por não serem os hospedeiros naturais para o vírus, haveria poucos ciclos replicativos ou mesmo, como é comum para *Enterovirus* (Lipton & Friedman, 1980) a formação de muitas partículas vazias ou defectivas.

A infecção natural de ratos pelo TMEV seria possível mediante a replicação do vírus no cérebro destes animais. Neste caso, a persistência de sintomas e sobrevivência, tanto na primeira quanto na segunda passagem, poderiam ser explicados por uma relação de baixa agressão. Ou seja, por serem de uma outra espécie animal, ao infectarem e adaptarem-se a um novo hospedeiro, cepas com baixa virulência podem ser selecionadas (Calenoff *et al.*, 1990).

Também poderia ser concluído que haveria, na suspensão intestinal, outros vírus entéricos que não o TMEV, capazes de induzirem sintomas clínicos semelhantes, com adaptação para o tecido nervoso. Neste caso, a relação de especificidade vírus-hospedeiro estaria impondo suas características. Uma vez que resultados negativos foram obtidos no RAP-TEST realizado nestes animais, pode-se concluir que as suspensões intestinais utilizadas nas inoculações não apresentavam outros vírus murinos. Este teste é amplamente utilizado como um método indireto para avaliação da resposta imune dos animais frente à contaminação por patógenos murinos, como vírus e bactérias. (De Souza & Smith, 1989).

Ainda com a possibilidade de se obter sucesso no isolamento deste vírus, células BHK-21 foram inoculadas com uma suspensão cerebral de ratos e camundongos, com sintomas clínicos sugestivos de TMEV. Foram realizadas quatro passagens sucessivas em células BHK-21 e na 4ª passagem foram observadas alterações celulares sugestivas de efeito citopático por TMEV. No entanto, quando sobrenadantes destes cultivos foram testados pela RT-PCR para TMEV, mostraram-se negativos. Este fato pode ser um indicativo da não adaptação do vírus TMEV, se existentes, nesta linhagem celular, como já foi comentado anteriormente quando da tentativa de isolamento viral das suspensões intestinais.

Para fazer uma associação da presença de sintomas clínicos com o fato dos ratos apresentarem anticorpos para TMEV-GDVII seria fundamental tentar identificar, por outras técnicas, a presença deste vírus. Com este objetivo, a técnica de RT-PCR foi empregada nas seguintes amostras: cérebro de camundongos e ratos inoculados com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, amostras de suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, sobrenadantes de células BHK-21 infectadas com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII e suspensão cerebral de ratos com sintomas para o TMEV e, ainda, amostras de suspensão fecal de ratos provenientes de quatro diferentes colônias convencionais. Neste último caso, foram coletadas amostras de biotérios convencionais de onde amostras anteriores teriam sido positivas ou não por IFI para TMEV.

Zoll *et al.* (1993) descreveram a aplicação de um ensaio de PCR utilizando uma sequência de *primers* localizada na região 5' não codificante do genoma para a detecção de vírus do gênero *Cardiovirus*, incluindo EMCV, Mengovírus e TMEV. A aplicabilidade do ensaio foi estudada com amostras de tecidos obtidos de camundongos experimentalmente infectados com TMEV. O RNA viral foi detectado após uma semana da inoculação em tecidos como músculos, coração, fígado, pâncreas e cérebro. Estes resultados demonstraram a utilização da técnica de RT-PCR como um método alternativo, e com grande aplicabilidade, quando comparado a outros métodos moleculares utilizados para “*screening*” de grande número de amostras.

Pela técnica de RT-PCR foram testadas noventa e seis amostras diferentes, com *primers* já descritos na literatura (Zoll *et al.*, 1993). De acordo com os relatos publicados por estes autores, e com o objetivo de identificar um possível vírus de rato pertencente ao

gênero *Cardiovirus*, optou-se por utilizar o par de *primer* identificado como *primer 1* e *primer 2*, para a detecção de RNA viral de TMEV e EMCV. Os *primers* selecionados foram utilizados tanto para a síntese do cDNA quanto para as reações de amplificação. Produtos amplificados com tamanhos próximos a 283pb-284pb foram detectados quando da análise de cérebros de ratos inoculados tanto com a suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII, como aqueles (camundongos e ratos) inoculados com TMEV-GDVII.

Dentre as quarenta e oito amostras de suspensão de fezes de ratos analisadas, apenas seis apresentaram-se positivas, o que revela 12,5% de reações RT-PCR positivas para TMEV em amostras de suspensão de fezes de ratos de biotérios convencionais. Por outro lado as amostras de suspensão intestinal, utilizadas como inóculo em ratos e camundongos e em células BHK-21, bem como os sobrenadantes de células infectadas, foram negativas por RT-PCR para TMEV e EMCV.

Sendo assim, como explicar os resultados negativos de RT-PCR para as amostras de suspensão intestinal utilizadas como inóculo, mas que induziram sinais clínicos em camundongos e ratos que tiveram, por sua vez, cérebros positivos, pela RT-PCR para TMEV? Uma série de questionamentos poderia ser levantada com relação a estes resultados e, um deles refere-se à extração do RNA viral. Atualmente, diferentes protocolos para extração de RNA viral podem ser utilizados, sejam os métodos clássicos com Isotiocianato de guanidina (Chomczynski & Sacchi, 1987), TRIzol ou a utilização de kits comerciais. A grande maioria dos métodos apresenta vantagens, embora alguns autores considerem que a utilização de TRIzol forneça RNA com maior pureza (Xiang *et al.*, 2001, Barbezang & Jestin, 2002). No presente trabalho, as amostras de RNA foram obtidas com a utilização de TRIzol, embora algumas modificações tenham sido feitas na tentativa de melhorar a eficiência da extração. Por exemplo, a uma das etapas da extração foi adicionado glicogênio, conhecido não só por melhorar a eficiência da extração, mas por facilitar a precipitação do RNA com etanol. Embora tenham sido obtidos resultados positivos com esta metodologia para os cérebros de animais inoculados, as amostras de suspensão intestinal, usadas como inóculo, mantiveram-se negativas. Este fato poderia estar associado a uma possível perda do RNA viral durante o processo de extração, ou a baixas quantidades de vírus nas amostras testadas, embora a RT-PCR seja uma técnica com alta sensibilidade (Barbezang & Jestin, 2002; Kassimi *et al.*, 2002).

É de conhecimento na ciência de animais de laboratório, a ampla utilização da RT-PCR na rotina de monitoração de agentes como vírus, bactérias e parasitas, presentes em colônias de camundongos e ratos (Taylor & Copley, 1994; Feldman, 2001). Embora estas técnicas moleculares sejam altamente aplicáveis e forneçam resultados rápidos, deve-se ressaltar a importância da utilização dos métodos sorológicos tradicionais para o diagnóstico de infecções por vírus e bactérias (Compton & Ryley, 2001; Feldman, 2001).

A sequência do genoma de TMEV foi publicada por Pevear *et al.* (1987), que propuseram a classificação deste vírus como pertencente ao gênero *Cardiovirus* e não ao gênero *Enterovirus*, como descrito em trabalhos anteriores (Rozhon *et al.*, 1982). O genoma dos vírus da família *Picornaviridae* apresenta RNA “uncapped” e a região 5’ com estruturas secundárias que são importantes para que o RNA seja traduzido de forma eficiente, o que não acontece com vírus de outras famílias que possuem RNA “uncapped” (Jackson *et al.*, 1990). O elemento IRES foi definido como uma estrutura secundária com sequência de 450 nucleotídeos, onde os ribossomos se ligam e fazem a leitura do RNA deste ponto de ligação, geralmente no sentido 5’ – 3’ até o códon de iniciação AUG (Jackson *et al.*, 1990). Dentre os *Cardiovirus*, esta região é bastante conservada, servindo, portanto, para a tentativa de verificar pela presença de um vírus que pudesse ser inserido neste gênero.

Os resultados positivos obtidos pela técnica de RT-PCR para as amostras de cérebro de camundongos e ratos inoculados tanto com suspensão intestinal, bem como para as amostras de suspensão fecal de ratos de diferentes biotérios com colônias convencionais, podem confirmar a presença de um *Cardiovirus* em ratos. Assim como os dados de Ohsawa *et al.* (2003), ratos se infectariam com um provável TMEV que, experimentalmente, não levaram à sinais clínicos semelhantes à infecção por TMEV em camundongos. Embora utilizando *primers* para regiões conservadas de TMEV e EMCV, estes autores não obtiveram sucesso na detecção do RNA do isolado NGS910, o que sugeriria que este isolado poderia ser incluído em um novo subgrupo dentro dos *Cardiovirus*.

Nos resultados aqui relatados foi detectado RNA por RT-PCR para *Cardiovirus* em diferentes amostras de ratos, quer inoculados experimentalmente com TMEV-GDVII, quer em fezes de ratos de biotérios convencionais. Também foi possível definir por sinais clínicos em animais experimentalmente inoculados, assim ratos se infectariam naturalmente com

Cardiovirus. Para uma classificação final e uma caracterização definitiva, outros testes devem ser realizados, quer relativos à análise de seqüências gênicas, quer relativos a identidades antigênicas

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho levaram às seguintes conclusões:

1. Anticorpos anti-TMEV-GDVII foram detectados pela reação de Imunofluorescência indireta em 86,3% dos soros de ratos provenientes de colônia convencional. Portanto, ratos mantidos em colônias convencionais podem se infectar naturalmente por TMEV ou por vírus relacionados;
2. O ensaio de soroneutralização demonstrou que 77,2% dos soros de ratos testados apresentavam anticorpos com capacidade de neutralizar a infectividade por TMEV-GDVII em sistema celulares;
3. Mesmos após nove passagens de suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII em células BHK-21, não foram isolados TMEV ou vírus relacionados;
4. Camundongos e ratos inoculados intracerebralmente com suspensão intestinal de ratos soropositivos para TMEV-GDVII demonstraram sinais clínicos típicos da infecção por TMEV em camundongos. Os sinais clínicos foram caracterizados por paralisia flácida das patas posteriores, tremores e perda de peso;
5. A reação de RT-PCR para regiões conservadas de *Cardiovirus* foi positiva para amostras de cérebro de ratos e camundongos inoculados tanto com a suspensão intestinal quanto com a cepa padrão TMEV-GDVII, e para seis amostras de suspensão fecal de ratos de diferentes colônias convencionais;
6. A técnica de RT-PCR pode ser utilizada em rotina de monitoração sanitária para o diagnóstico de TMEV e EMCV em fezes de camundongos e ratos com infecção assintomática ou não.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effect on research. **Clin. Microbiol. Rev.** **11**(2): 231 – 266, 1998.
- BARBEZANG, C., JESTIN, V. Development of a RT-nested PCR test detecting pigeon Paramyxovirus-1 directly from organs of infected animals. **J. Virol. Meth.** **106**: 197 – 201, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** **72**: 248 - 254, 1976.
- BRAHIC, M., BUREAU, JF. Genetics of susceptibility to Theiler's virus infection. **Bioessays** **20**: 627 – 633, 1998.
- BRAHIC, M. Theiler's virus infection of the mouse, or: Of the importance of studying animal models. **Virology** **301**: 1 - 5, 2002.
- BROWNSTEIN, D., BHATT, P.N., ARDITO, R., PATURZO, F., JOHNSON, E. Duration and patterns of transmission of Theiler's mouse encephalomyelitis virus infection. **Lab. Anim. Sci.** **39** (4): 299-301, 1989.
- BUREAU, J.F., MONTAGUTELLI, X., LEFEBVRE, S., GUÉNET, J.L., P.L.A, M., BRAHIC, M. The interaction of two groups of murine genes determines the persistence of Theiler's virus in the central nervous system. **J. Virol.** **66** (8): 4698 – 4704, 1992.
- BURLESON, F.G., CHAMBERS, T.M., WIEDBRAUK, D.I. Hemagglutination assay. In: **Virology: A Laboratory Manual** (Eds.). San Diego, Califórnia. Academic Press, Inc., p. 87 – 92, 1992a.

- BURLESON, F.G., CHAMBERS, T.M., WIEDBRAUK, D.I. Encephalomyocarditis virus neutralization. In: **Virology: A Laboratory Manual** (Eds.). San Diego, California. Academic Press, Inc., p. 125 – 129, 1992 b.
- CALENOFF, M.A., FAABERG, K.S., LIPTON, H.L. Genomic regions of neurovirulence and attenuation in Theiler murine encephalomyelitis virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87**: 978 – 982, 1990.
- CAMERON, K., ZHANG, X., SEAL, B., RODRIGUEZ, M., NJENGA, M.K. Antigens to viral capsid and non-capsid proteins are present in brain tissues and antibodies in sera of Theiler's virus-infected mice. **J. Virol. Meth. 91**: 11-19, 2001.
- CASALS, J. Immunological characterization of Vilyuisk human encephalomyelitis virus. **Nature 200**: 339-341, 1963.
- CASH, E., CHAMORRO, M., BRAHIC, M. Theiler's virus and protein synthesis in the central nervous system of demyelinating mice. **Virol 114**: 290 – 294, 1985.
- CHERNESKY, M.A. Traditional serological tests. In: MAHY, B.W.J., KANGRO, H.O. (Eds.). **Virology Methods Manual**, cap. 6, p.107 - 109. Academic Press Inc., 1996.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem. 162**: 156 - 159, 1987.
- CLATCH, R.J., MELVOLD, R.W., MILLER, S.D., LIPTON, H.L. Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) induced demyelinating disease in mice is influenced by the H-2D region, correlation with TMEV-specific delayed-type hypersensitivity. **J. Immunol. 135**: 1408 - 1414, 1985.

- CLATCH, R.J., LIPTON, H.L., MILLER, S.D. Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) – specific delayed-type hypersensitivity response in TMEV induced demyelination disease, correlation with clinical signs. **J. Immunol.** **136**: 920 – 927, 1986.
- COMPTON, S.R., RILEY, L.K. Detection of infectious agents in laboratory rodents: traditional and molecular techniques. **Comp. Med.** **51** (2): 113 - 119, 2001.
- DAL CANTO, M.C., LIPTON, H.L. Ultra-structural immunohistochemical localization of virus in acute and chronic demyelinating Theiler's virus infection. **Am. J. Pathol.** **106**: 20 - 29, 1982.
- DALES, S., EGGERS, H.J., TAM, I., PALADE, G.E. Electron microscope study of the formation of poliovirus. **Virology**. **26**: 379 – 389, 1965.
- DANIELS, J.B., PAPPENHEIMER, H., RICHARDSON, S. Observation on encephalomyelitis of mice (DA strain). **J. Exp. Med.** **96**: 517 - 530, 1952.
- DENIS, P., KOENEN, F. Molecular analysis of the capsid coding region of a virulent encephalomyocarditis virus isolate after serial cell passages and assessment of its virulence. **Arch. Virol.** **148**: 903 – 912, 2003.
- DESCOTEAUX, J.P., GRIGNON - ARCHAMBAULT, D., LUSSIER, G. Serologic study on the prevalence of murine viruses in five Canadian mouse colonies. **Lab. Anim. Sci.** **27**(5): 621 - 626, 1977.
- DE SOUZA, M., SMITH, A.L. Comparison of isolation in cell culture with conventional and modified mouse antibody production tests for detection of murine viruses. **J. Clin. Microbiol.** **27**: 185 - 187, 1989.

DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL INFECTIONS OF LABORATORY

RODENTS: Preparation of antisera. Murine Virus Diagnostic Laboratory, Bethesda, Maryland: Microbiological Associates Inc., p.40, 1978.

DOWNS, W.G. Mouse Encephalomyelitis Virus. In: FOSTER, H.L., SMALL, J.D., FOX, J.G. (Eds.). **The Mouse in Biomedical Research**, Volume II: Diseases. Academic Press, New York, 1982.

FASTIER, L.B. The inhibition of GDVII virus hemagglutination by normal tissue extracts. **J. Immunol. 66:** 87 – 97, 1951a.

FASTIER, L.B. Factors involved in haemagglutination by the GDVII strain of murine encephalomyelitis virus. **J. Immunol. 66:** 365 -378, 1951b.

FELDMAN, S.H. Diagnostic molecular microbiology in laboratory animal health monitoring and surveillance programs. **Lab. Anim. 30** (10): 34 – 42, 2001.

FIETTE, L., AUBERT, C., BRAHIC, M., ROSSI, C.P. Theiler's virus infection of β_2 - microglobulin deficient mice. **J. Virol. 67** (1): 589 – 592, 1993.

FLINT, S.J., ENQUIST, L.W., KREIG, R.M., RACANIELLO, V.R., SKAEKA, A.M. Genome replication and mRNA production by RNA viruses. In: **Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control**. Washington, D.C., ASM Press, p.163 – 196, 2000 a.

FLINT, S.J., ENQUIST, L.W., KREIG, R.M., RACANIELLO, V.R., SKAEKA, A.M. Translation control of viral gene expression. In: **Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control**. Washington, D.C., ASM Press, p.377–383, 2000 b.

- FRESHNEY, R.I. Maintenance of the culture: Cell Lines. In: FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. New York: Wiley-Liss Inc., p. 149 - 159, 1993.
- FRIEDMANN, A.; LIPTON, H.L. Replication of Theiler's murine encephalomyelitis viruses in BHK - 21 cells: an electron microscopic study. **Virology** **101**: 389 - 398, 1980.
- FUJINAMI, R.S., ROSENTHAL, A., LAMPERT, P.W., ZURBRIGGEN, A., YAMADA, M. Survival of athymic nu/nu mice after Theiler's murine encephalomyelitis virus infection by passive administration of neutralizing monoclonal antibody. **J. Virol.** **63**: 2081 - 2087, 1989.
- FU, J., RODRIGUEZ, M. ROOS, R.P. Strains from both Theiler's virus subgroups encode a determinant for demyelination. **J. Virol.** **64** (12): 6345 - 6348, 1990.
- GILIOLI, R., SAKURADA, J.K., ANDRADE, L.A.G., KRAFT, V., MEYER, B., RANGEL, H.A. Virus infection in rat and mouse colonies reared in Brazilian animal facilities. **Lab. Anim. Sci.** **46** (5): 582 - 584, 1996.
- GILIOLI, R. Controle virológico em animais de laboratório. In: DE LUCCA, R.R., ALEXANDRE, S.R., MARQUES, T., SOUZA, N.L., MERUSSE, J.L.B., NEVES, S.P. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2ª Edição. São Paulo: COBEA - FINEP, p.139-148, 1996.
- GILIOLI, R., ANDRADE, L.A.G., PASSOS, L.A.C., SILVA, F.A., RODRIGUES, D.M., GUARALDO, A.M.A. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** **52** (1): 33-37, 2000.

- GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros:** ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Área de Microbiologia. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 138p., 2003.
- GOVERMAN, J.; BRABB, T. Rodent models of experimental allergic encephalomyelitis applied to the study of multiple sclerosis. **Lab. Anim. Sci.** **46** (5): 482- 492, 1996.
- HANSEN, A.K. Health status and the effects of microbial organisms on animal experiments. In: SVENDSEN, P., HAN, J. **Handbook of laboratory animal science. Vol I: Selection and handling of animals in biomedical research**, CRC Press, Cap 11, p. 125–153, 1994.
- HANSEN, A.K., THOMSEN, P., JENSEN, HJ.S. A serological indication of the existence of a guinea pig poliovirus. **Lab. Anim.** **31**: 212 - 218, 1997.
- HANSEN, A.K., VELSCHOW, S., CLAUSEN, F.B., SVENDSEN, O., AMTOFT-NEUBAUER, H., KRISTENSEN, K., JORGENSEN, P.H. New infections to be considered in health monitoring of laboratory rodents. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.** **27** (2): 65 – 83, 2000.
- HEMELT, I.E., HUXSOLL, D.L., WARNER JR, A.R. Comparison of MHG virus with mouse encephalomyelitis viruses. **Lab. Anim. Sci.** **24** (3): 523 - 529, 1974.
- HIERHOLZER, J.C., KILLINGTON, R.A. Virus isolation and quantification. In: MAHY, B.W.J., KANGRO, H.O.(Eds.). **Virology Methods Manual**, cap. 2, p.25 - 42. Academic Press Inc., 1996.
- HSU, C.K., NEW, A.E., MAYO, J.G. Quality assurance of rodent models. In: SPIEGEL,A., ERICHSEN,S., SOLLEVELD, H.A.(Eds.). **Animal Quality and Models in Biomedical**

Research, 7th ICLAS Symposium Utrecht, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York, 1979.

<http://www.criver.com/techdocs/ratgd/html>. Significance of GDVII antibody titers in rats. May, 1994.

JACKSON, R.J., HOWELL, M.T., KAMINSKI, A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. **Trends Biochem. Sci.** **15**: 477 – 483, 1990.

JACOBY, R.O., LINDSEY, J.R. Health care for research animals is essential and affordable. **The FASEB J.** **11**: 609 – 614, 1997.

JNAOUI, K., MICHIELS, T. Adaptation of Theiler's virus to L929 cells: mutations in the putative receptor binding site on the capsid map to neutralization sites and modulate viral persistence. **Virology**. **244**: 397 – 404, 1998.

KASSIMI, L.B., GONZAGUE, M., BOUTROUILLE, A., CRUCIERE, C. Detection of encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and one-step RT-PCR. **J. Virol. Meth.** **101**: 197 – 206, 2002.

KILHAN, L., MASON, P., DAVIES, J.N.P. Host-virus relations in encephalomyocarditis (EMC) virus infections. I. Infections of wild rats. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **5**: 647 – 663, 1956.

KONG, W.P., GHADGE, G.D., ROOS, R.P. Involvement of cardiovirus leader in host cell-restricted virus expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**: 1796 – 1800, 1994.

KRAFT, V., MEYER, B. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. **Lab. Anim. Sci.** **36** (3): 271 - 276, 1986.

- KRAFT, V., MEYER, B. Seromonitoring in small laboratory animal colonies. A five year survey: 1984 – 1988. **Z. Versuchstierkd** **33**: 29- 35, 1990.
- LAHELLE, O., HORSFALL, F.L. Hemagglutination with the GDVII strain of mouse encephalomyelitis virus. **Proc. Soc. Exp.Biol. Med.** **71**: 713 – 718, 1949.
- LARSEN, G.R., DORNER, A.J., HARRIS, T.J.R., WIMMER, E. The structure of poliovirus replicative form. **Nuc. Acids Res.** **8**: 1217 - 1229, 1980.
- LIPTON, H.L. Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. **Infect. Immun.** **11**: 1147 - 1155, 1975.
- LIPTON, H.L., DAL CANTO, M.C. Susceptibility of inbred mice to chronic central nervous system infection by Theiler's murine encephalomyelitis virus. **Infect. Immun.** **26**(1): 369 -374, 1979.
- LIPTON, H., FRIEDMANN, A. Purification of Theiler's murine encephalomyelitis virus and analysis of the structural virion polypeptides: correlation of the polypeptide profile with virulence. **J. Virol.** **33**(3): 1165 - 1172, 1980.
- LIPTON, H.L., ROZHON, E.J. The Theiler's murine encephalomyelitis viruses. In: BHATT, P.N., JACOBY, R.O., MORSE III, H.C., NEW, A.E. (Eds.) **Viral and Mycoplasmal Infections of laboratory rodents: effects on biomedical research.** Academic Press Inc., London, 1986.
- LIPTON, H.L., CALENOFF, M., BANDYOPADHYAY, P., MILLER, S.D., DAL CANTO, M.C., GERETY, S., JENSEN, K. The 5' noncoding sequences from a less virulent Theiler's virus dramatically attenuate GDVII neurovirulence. **J. Virol.** **65** (8): 4370 – 4377, 1991.

- LIPTON, H.L., TWADDLE, G., JELACHICH, M.L. The predominant virus antigen burden is present in macrophages in Theiler's murine encephalomyelitis virus induced demyelinating disease. **J. Virol.** **69** (4): 2525-2533, 1995.
- LIPTON, H.L., KIM, B.S., YAHIKOZAWA, H., NADLER, C.F. Serological evidence that *Mus musculus* is the natural host of Theiler's murine encephalomyelitis virus. **Vir. Res.** **76**: 79 - 86, 2001.
- LORCH, Y., FRIEDMANN, A., LIPTON, H.L., KOTLER, M. Theiler's murine encephalomyelitis virus group includes two distinct genetic subgroups that differ pathologically and biologically. **J. Virol.** **40** (2): 560 - 567, 1981.
- LUO, M., TOTH, K.S., ZHOU, L., PRITCHARD, A., LIPTON, H.L. The structure of a highly virulent Theiler's murine encephalomyelitis virus (GDVII) and implications for determinants of viral persistence. **Virol.** **220** (1): 246 - 250, 1996.
- LUO, M. The structure of Theiler's virus complexed with its receptor. **Exp. Progr. Repo**, p. 7-57 - 7-60, SSRL Activity Report, 1997.
- LUSSIER, G., DESCOTEAUX, J.P. Prevalence of natural infections in laboratory mice and rats used in Canada. **Lab. Anim. Sci.** **36**: 145 - 148, 1986.
- MARTINAT, C., JAROUSSE, N.; PREVOST, MC., BRAHIC, M. The GDVII strain of Theiler's spreads via axonal transport. **J. Virol.** **73**(7): 6093 - 6098, 1999.
- McCONNELL, S.J., HUXSOLL, D.L., GARNER, F.M. Isolation and characterization of a neurotropic agent (MHG virus) from adult rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **115**: 362 - 367, 1964.

- MICHIELS, T., JAROUSSE, N., BRAHIC, M. Analysis of the leader and capsid coding regions of persistent and neurovirulent strains of Theiler's virus. **Virology** **214**: 550 – 558, 1995.
- MILLER, S.D., CLATCH, R.J., PEVEAR, D.C., TROTTER, J.L., LIPTON, H.L. Class II - restricted T cell responses in Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) induced demyelinating disease. I. Cross-specificity among TMEV substrains and related picornaviruses, but not myelin proteins. **J. Immunology** **138**: 3776 - 3784, 1987.
- MILLER, S.L. Nongenetic animal models of myelin disorders. In: BOULTON, A., BAKER, G., BUTTERWORTH, R. (Eds.). **Neurobiology**, Vol. **21**, p.205 - 273. The Humana Press, Inc., 1992.
- NICKLAS, W., HOMBERGER, F.R., ILLGEN-WILCKLE, B., JACOBY, K., KRAFT, V., KUNSTYR, I., MÄHLER, M., MEYER, H., POHLMAYER-ESCH, G. Implications of infectious agents on results of animal experiments. Report of the Working Group on Hygiene of the Gesellschaft für Versuchstierkunde – Society for Laboratory Animal Science. **Laboratory Animals** **33** (supplement 1), Laboratory Animal Health Monitoring, 1999.
- NITAYAPHAN, S., TOTH, M.M., ROOS, R.P. Neutralizing monoclonal antibodies to Theiler's murine encephalomyelitis viruses. **J. Virology** **53** (2): 651 - 657, 1985a.
- NITAYAPHAN, S., TOTH, M.M., ROOS, R.P. Localization of a neutralization site of Theiler's murine encephalomyelitis viruses. **J. Virology** **56** (3): 887 - 895, 1985b.
- OBUCHI, M., YAMAMOTO, J., ODAGIRI, T., NASIR UDDIN, M., IIZUKA, H., OHARA, Y. L* protein of Theiler's murine encephalomyelitis virus is required for virus growth in a murine macrophage-like cell line. **J. Virology** **74** (10): 4898 - 4901, 2000.

- OHSAWA, K., WATANABE, Y., MIYATA, H., SATO, H. Genetic analysis of a Theiler-like virus isolated from rats. **Comp. Med.** **53** (2): 191 - 196, 2003.
- OLITSKY, P.K. A transmissible agent (Theiler's virus) in the intestines of normal mice. **J. Exp. Med.** **72**: 113- 127, 1940.
- OLITSKY, P.K. Certain properties of Theiler's virus, especially in relation to its use as model for poliomyelitis. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **58**: 77-81, 1945.
- OZDEN, S., TANGY, F., CHAMORRO, M., BRAHIC, M. Theiler's virus genoma is closely related to that of encephalomyocarditis virus, the prototype cardiovirus. **J. Virol.** **60** (3): 1163 -1165, 1986.
- PARKER, J.C., O'BEIRNE, A.J., COLLINS Jr., M.J. Sensitivity of enzyme linked immunosorbent assay, complement fixation and hemagglutination inhibition tests for detection of Sendai virus antibody in laboratory mouse. **J. Clin. Microbiol.** **9**: 444 - 447,1979.
- PENA-ROSSI, C., CASH, E., AUBERT, C., COUTINHO, A. Role of the humoral immune response in resistance to Theiler's virus infection. **J. Virol.** **65** (7): 3895 – 3899, 1991.
- PENA-ROSSI, C., DELCROIX, M., HUITINGA, I.,McALLISTER, A., VAN ROOIJEN, N., CLAASSEN, E., BRAHIC, M. Role of macrophages during Theiler's virus infection. **J. Virol.** **71**: 3336 – 3340, 1997.
- PEVEAR, D.C., CALENOFF, M., ROHZON, E., LIPTON, H.L. Analysis of the complete nucleotide sequence of the picornavirus Theiler's murine encephalomyelitis virus indicates that it is closely related to Cardiovirus. **J. Virol.** **61** (5): 1507 - 1516, 1987.

- PEVEAR, D.C., BORKOWSKY, J., CALENOFF, M.A., OH, C.K., OSTROWSKI, B., LIPTON, H.L. Insights into Theiler's virus neurovirulence based on a genomic comparison of the neurovirulent GDVII and less virulent Be An strains. **Virology** **165**: 1-12, 1988.
- PRITCHARD, A.E., STROM, T., LIPTON, H.L. Nucleotide sequence identifies Vilyuisk virus as a divergent Theiler's virus. **Virology** **191**: 469 - 472, 1992.
- PRITCHARD, A.E., CALENOFF, M.A., SINMPSON, S., JENSEN, K., LIPTON, H.L. A single base deletion in the 5' noncoding region of Theiler's virus attenuates neurovirulence. **J. Virol.** **66 (4)**: 1951 - 1958, 1992.
- REHBINDER, C. Health monitoring. In: SVENDSEN, P., HAU, J. (Eds.). **Handbook of laboratory animal science: Selection and handling of animals in biomedical research**. Boca Raton, Florida. CRC Press, Inc., Vol. I, p. 155-167, 1994.
- RODRIGUEZ, M., LEIBOWITZ, J.L., LAMPERT, P.W. Persistent infection of oligodendrocytes in Theiler's virus induced encephalomyelitis. **Ann. Neurol.** **13**: 426 - 433, 1983.
- RODRIGUEZ, M., LUCCHINETTI, C.F., CLARK, R.J., YAKSH, T.L., MARKOVITZ, H., LENNON, V.A. Immunoglobulins and complement in demyelination induced in mice by Theiler's virus. **J. Immunol.** **140**: 800 - 806, 1988.
- ROOS, R.P., WOLLMANN, R. DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus induces demyelination in nude mice. **Ann. Neurol.** **15**: 494 - 499, 1984.
- ROOS, R.P., NALEFSKI, E.A., NITAYAPHAN, S., VARIAKOJIS, R., SINGH, K.K. Polyprotein processing of Theiler's murine encephalomyelitis virus. **J. Virol.** **63**: 5344-5353, 1989.

- ROSENTHAL, A., FUJINAMI, R.S., LAMPERT, P.W. Mechanisms of Theiler's virus induced demyelination in nude mice. **Lab. Invest.** **54**: 515 – 522, 1986.
- ROZHON, E.J., LIPTON, H.L., BROWN, F. Characterization of Theiler's murine encephalomyelitis virus RNA. **J. Gen. Virol.** **61**: 157 – 165, 1982.
- RUECKERT, R.R. – *Picornaviridae* and their replication. In: **Virology**. Fields, B.N.; KNIPE, R.M.; CHANOCK, M.S.; HIRSCH, J.L.; MELNICK, T.P. Monath & B. Roizman, (Eds.). Raven New York, 1996.
- SUZUKI, E., MOCHIDA, K., NAKAGAWA, M. Serological survey of *Corynebacterium kutscheri* infection in mice and rats. **Exp. Anim.** **35**: 485 – 489, 1986.
- TANGY, F., McALLISTER, A., AUBERT, C., BRAHIC, M. Determinants of persistence and demyelination of the DA strain of Theiler's virus are found only in the VP1 gene. **J. Virol.** **65**: 1616-1618, 1991.
- TAYLOR, K., COPLEY, C.G. Detection of rodent RNA viruses by polymerase chain reaction. **Lab. Anim.** **28**: 31 - 34, 1994.
- TESH, R.B., WALLACE, G.D. Observations on the natural history of encephalomyocarditis virus. **The Am. J. Trop. Med. Hyg** **27** (1): 133-143, 1978.
- THEILER, M. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. **Science** **80**: 122, 1934.
- THEILER, M. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. **J. Exp. Med.** **65**: 705 - 719, 1937.
- THEILER, M., GARD, S. Encephalomyelitis of mice. I. Characterization and pathogenesis of the virus. **J. Exp. Med** **72**: 49 - 67, 1940a.

- THEILER, M., GARD, S. - Encephalomyelitis of mice. III. Epidemiology. **J. Exp. Med** **72**: 79-90, 1940b.
- TROTTIER, M., KALLIO, P., WANG, W., LIPTON, H.L. High numbers of viral RNA copies in the central nervous system of mice during persistent infection with Theiler's virus. **J. Virol.** **75** (16): 7420-7428, 2001.
- TSUNODA, I., IWASAKI, Y., TERUNUMA, H., SAKO, K., OHARA, Y. A comparative study of acute and chronic diseases induced by two subgroups of Theiler's murine encephalomyelitis virus. **Acta Neuropathol.** **91**: 595 - 602, 1996.
- VANELLA, J.M., KISSLING, R.E., CHAMBERLAIN, R.W. Transmission studies with encephalomyocarditis virus. **J. Infect. Dis.** **98**: 98 – 102, 1956.
- XIANG, X., QIU, D., HEGELE, R.D., TAN, W.C. Comparison of different methods of total RNA extraction for viral detection in sputum. **J. Virol. Meth.** **94**: 129 – 135, 2001.
- YAMADA, M., ZURBRIGGEN, A., FUJINAMI, R. Pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus. **Adv. Vir. Res.** **39**: 291 - 320, 1991.
- ZENNER, L., REGNAULT, J.P. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study. **Lab. Anim.** **34**: 76-83, 2000.
- ZOLL, J., GALAMA, J., MELCHERS, W. Molecular identification of cardioviruses by enzymatic amplification. **Mol. Cel. Probes** **7**: 447 - 452, 1993.
- ZURBRIGGEN A., HOGLE, J., FUJINAMI, R.S. Alteration of amino acid 101 within capsid protein VP1 changes the pathogenicity of Theiler's murine encephalomyelitis virus. **J. Exp. Med.** **170**: 2037 – 2049, 1989.

8. ANEXOS

8.1. Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal.

8.2. Análise filogenética da seqüência de RNA do isolado NGS910.

8.1. Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **424-1**, sobre "**ESTUDO DA ESPECIFICIDADE DE ANTICORPOS ANTI -TMEV-GDVII (VIRUS DA ENCEFALOMIELE MURINA DE THEILER) POR MÉTODO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) EM COLÔNIAS DE RATOS MANTIDOS SOB CONDIÇÕES CONVENCIONAIS**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti/Daniele Masselli Rodrigues** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de julho de 2002.

C E R T I F I C A T E

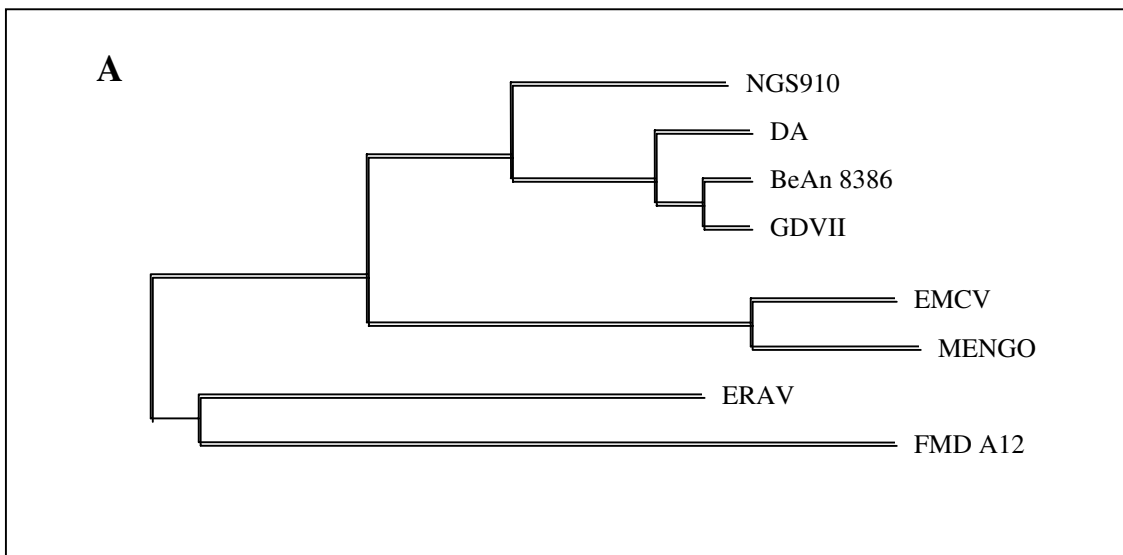
We certify that the protocol nº **424-1**, entitled "**AN STUDY OF ANTIBODIES ANTI -TMEV-GDVII (THEILER MURINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS) SPECIFICITY BY AN IMMUNOENZYMATIC ASSAY (ELISA) DETECTED IN RAT COLONIES BRED UNDER NON-BARRIER SYSTEM**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on July 4, 2002.

Profa. Dra. Liana Verinaud
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

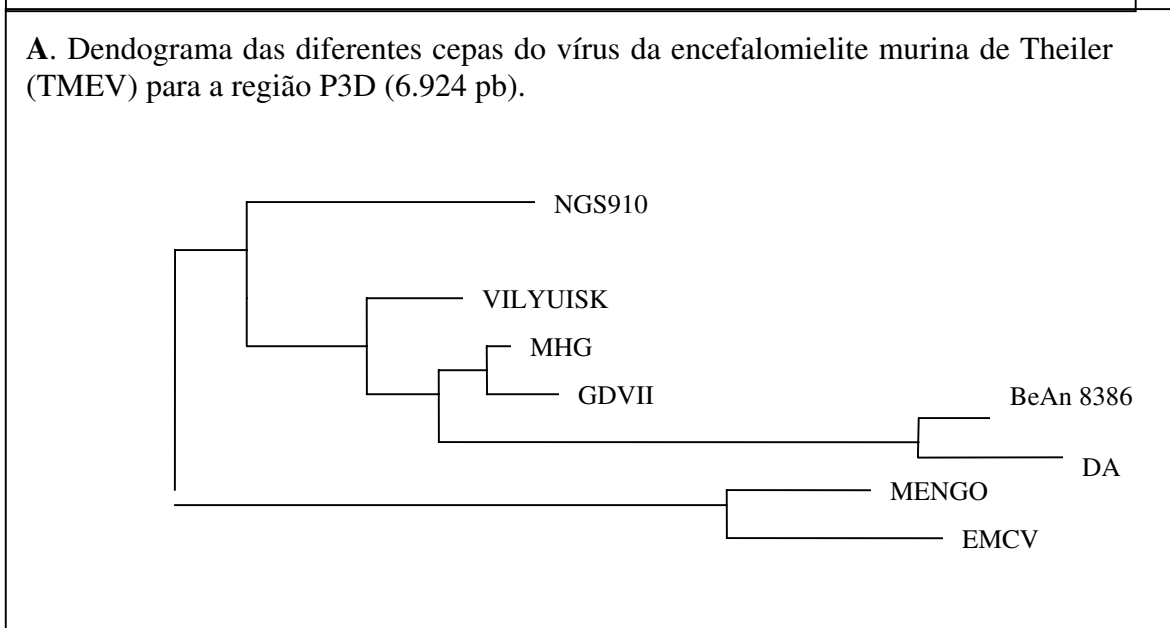
2a. VIA
Campinas, 09 de Março de 2004.

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

8.2. Análise filogenética da seqüência de RNA do isolado NGS910.



A. Dendograma das diferentes cepas do vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) para a região P3D (6.924 pb).



B. Dendograma das diferentes cepas do vírus da encefalomielite murina de Theiler (TMEV) para a região que codifica para a proteína L* (471 pb).

Fonte: Ohsawa, K., Watanabe, Y., Miyata, H., Sato, H. **Comp. Med** 52 (2): 191-196, 2003.