

Comunicado 12

Técnico

On line

ISSN 1676-7675
Sobral, CE
Dezembro, 2006



Protocolos para Extração do DNA-proviral e PCR do Lentivírus Caprino em Sangue

Alice Andrioli¹
Kelma Costa de Souza²
Raymundo Rizaldo Pinheiro³
Fabiane Maria Lima Sousa²

A Artrite Encefalite Caprina (AEC), causada pelo lentivírus caprino (LVC), é uma enfermidade crônica, incurável e multisistêmica (Cork et al. 1974). A ocorrência da AEC em um rebanho caprino leva a perdas econômicas consideráveis, inclusive a queda na produção de leite.

Para o controle efetivo dessa enfermidade, é importante que os métodos de diagnóstico identifiquem todos os animais portadores, visto que a AEC é, muitas vezes, assintomática e pode ser transmitida pelo contato direto entre os animais, além de apresentar várias outras vias de transmissão (ingestão de leite/colostró; secreções; instrumentos perfurantes contendo sangue de animais contaminados, dentre outras).

Dessa forma, a manutenção de animais falso-negativos no rebanho representa sérios problemas sanitários, dificultando o controle da doença.

Os testes diagnósticos podem ser divididos em dois tipos: os que detectam os anticorpos, por exemplo, o teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o enzyme linked immunoassay (ELISA) e, os que detectam diretamente o

agente, que são isolamento viral, a hibridização *in situ* e a reação de cadeia da polimerase (PCR).

Devido à confiabilidade e à facilidade na coleta das amostras, os testes para detecção de anticorpos anti-AEC, como o IDGA e o ELISA, permanecem sendo os mais utilizados.

Como a infecção dos monócitos e macrófagos pelos lentivírus é persistente e há a recorrente expressão dos genes virais estimulando o sistema imune (Cheevers et al. 1988) há, normalmente, anticorpos circulantes no soro dos animais infectados.

No entanto, o nível de anticorpos circulantes varia entre animais e no mesmo animal, dependendo do seu estado fisiológico. No teste de IDGA, a reação positiva só ocorre num nível determinado de anticorpos, de forma que, se o nível de anticorpos estiver abaixo do detectável, o animal será falso-negativo ao teste.

Dentre as técnicas utilizadas para o diagnóstico direto de patógenos, destaca-se a PCR, cujo objetivo é a amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos, permitindo a obtenção

¹Med. Vet., D. Sc., Embrapa Caprinos. Estrada Sobral/Groaíras, Km 04, Caixa Postal 145, CEP 62010-970 - Sobral/CE. Email: alice@cnpce.embrapa.br

²Bolsista, Zootecnia, Universidade Estadual Vale do Acaraú.

³Med. Vet., D. Sc., Embrapa Caprinos. E-mail: rizaldo@cnpce.embrapa.br

de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA.

A PCR vem sendo adotada em todo o mundo na pesquisa de microorganismos devido à sua especificidade, sensibilidade e rapidez de resultados (Belák & Ballagi-Pordány, 1993).

Os primeiros trabalhos sobre o uso da PCR apareceram no final dos anos 80, e têm sido de grande importância para o diagnóstico de doenças virais, em várias amostras de tecidos e secreções de animais. A vantagem da PCR é que esta técnica pode detectar pequenas quantidades de DNA viral presentes no material, amplificando-o em quantidades identificáveis.

Até mesmo patógenos de difícil crescimento em cultivo *in vitro* ou que se encontrem sob estado de latência ou integrados ao genoma do hospedeiro, ou microorganismos mortos, podem ser detectados por essa técnica.

Dentre as várias doenças virais de importância veterinária já detectadas por PCR, estão as lentiviruses de pequenos ruminantes (LVPR) (Zanoni et al., 1990).

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA proviral do lentivírus de caprinos em diferentes amostras, como: sangue, líquido sinovial, leite e soro do leite, tecidos e sêmen (Reddy et al., 1993; Rimstad et al., 1994; Barlough et al., 1994; Clavijo & Thorsen, 1996; Andrioli et al., 2006).

No caso dos LVPR, essa técnica é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou com resultado sorológico duvidoso (Rimstad et al., 1993). Porém, parece não haver relação entre o nível de anticorpos e o resultado positivo à PCR (Barlough et al., 1994) e nem todas as amostras de sangue positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR (Reddy et al., 1993).

Zanoni et al. (1990) demonstraram que a detecção do DNA proviral do LVPR em cultivo celular pode ser obtida um dia após inoculação e que o PCR apresentou alta sensibilidade, sendo capaz de identificar o vírus em uma célula infectada dentro de uma cultura contendo 10^6 células.

Barlough et al. (1994), observaram que uma amostra com três mil monócitos contendo de 30 a 240 células infectadas foi suficiente para gerar resultados positivos na PCR. Os autores avaliaram a quantidade de monócitos de amostras de sangue de cinco caprinos positivos para a AEC, diluíram essas amostras e realizaram PCR de cada uma delas para determinar, por cálculos, o número de monócitos necessários para obter reação positiva na PCR. Os dados revelaram uma quantitativa diferença no nível de

células associadas ao vírus entre os cinco animais testados, os quais variaram de 10^3 a 10^5 monócitos para a detecção.

Dessa forma, parece que a taxa de infecção dos monócitos varia entre indivíduos portadores da AEC, provavelmente devido ao nível de restrição da expressão viral (Narayan et al., 1983).

O objetivo deste trabalho foi padronizar um método eficaz de extração do DNA-proviral do LVC em amostras de sangue.

Foi coletado sangue em tubos vacuntainer de 5ml com EDTA, de três machos caprinos da raça Anglo-nubiana, com infecção comprovada sorologicamente por Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA).

Em seguida, as amostras de sangue foram processadas, segundo três protocolos de extração:

Protocolo "A", segundo Walsh et al. (1991):

- Colocar $5\mu\text{l}$ de sangue em tubos de eppendorf contendo 1ml de água destilada MilliQ autoclavada;
- Homogeneizar e centrifugar (1500g) por três minutos;
- Retirar o sobrenadante e acrescentar ao pellet $200\mu\text{l}$ de Chelex à 5%;
- Incubar as amostras à 56°C em banho-maria por 30 minutos e em vortex por 10 segundos;
- Incubar à 95°C , por oito minutos, e em vortex por 10 segundos;
- Centrifugar à $1000\text{-}1500\text{g}$ por três minutos;
- Armazenar as amostras entre 2 e 8°C .

Protocolo "B", segundo Caldas et al. (2000):

- Centrifugar 5ml de sangue por seis minutos a 4000g ;
- Retirar a camada de leucócitos ($100\mu\text{l}$) e colocar em eppendorf, juntamente com $500\mu\text{l}$ de solução de tris EDTA;
- Centrifugar por mais seis minutos à 4000g , retirar o sobrenadante e repetir a operação;
- Após a segunda centrifugação, o sobrenadante deve ser retirado. Ressuspender o pellet em $500\mu\text{l}$ de

Tampão K (10mM de Tris HCl pH 8,0; 50mM de KCl; 2mM de MgCl₂; 0,5% de Tween 20; 100µg/mL de proteinase K = 0,1µg/µL);

- Incubar as amostras em banho-maria por 45 minutos, a 56°C;
- Incubar a 95°C por 10 minutos;
- Armazenar as amostras entre 2°C e 8°C.

Protocolo "C", segundo Panteleeff et al. (1999):

- Centrifugar 5ml de sangue por seis minutos a 4000g;
- Retirar a capa de leucócitos (100µl) e acrescentar 1ml de PBS;
- Centrifugar a 1100g por cinco minutos;
- Retirar o sobrenadante e acrescentar mais 1ml de solução tampão salina, repetindo a operação;
- Retirar o sobrenadante e acrescentar ao pellet 1ml de tampão de lise (10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl; 100µg de gelatina; 0,45% de tween 20; 0,45% nonidet P-40; 60µg de proteinase K por mL);
- Incubar a 56°C por 90 minutos;
- Incubar as amostras por 20 minutos a 95°C;
- Centrifugar a 1100g por sete minutos;
- As amostras devem ser armazenadas a 20°C negativos.

Na amplificação do DNA, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, determinados a partir da região gag da amostra padrão CAEV-Cork (Saltarelli et al., 1990), sendo os iniciadores P1 = 5'CAAGC AGCAGGAGGGAGAAGCTG3' (posição genômica 953-975) e P2 = 5'TCCTACCCCC ATAATTTGATCCAC3' (posição genômica 1249-1226), descritos por Barlough et al., (1994), que amplificaram um fragmento alvo de 297 pb. Em seguida, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores internos P3 = 5'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' (posição genômica 997-1024) e P4 = 5' ACCTT TCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC 3' (posição genômica 1181-1154) para a segunda amplificação (Nested PCR), para a obtenção de um fragmento alvo final de 185 pb (Rimstad et al., 1993).

A reação de PCR Nested (PCRn) foi realizada segundo metodologia de Barlough et al. (1994), com algumas modificações. A reação consistiu de um volume total de 50µL, contendo: tampão Tris HCl (pH 8,3) 10mM; KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM; Gelatina 0,001% (p/v); dNTP, 100 µM de cada; TMAC 5µM ; 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (ciclo 1 – iniciadores P1 e P2; ciclo 2 – iniciadores P3 e P4); Taq DNA polimerase (2 UI); DNA da amostra: 3µL no ciclo 1 e 1 µL de produto do ciclo 1 no ciclo 2, sendo o volume final completado com água destilada MilliQ autoclavada.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Programmable Thermal Controller, PTC-100, MJ Research, Inc.), com os seguintes termais: um ciclo inicial para desnaturação a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto; 56°C por 1 minuto, 72°C por 45 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por 7 minutos e término a 4°C.

As amostras amplificadas e os controles positivo e negativo, juntamente com o marcador molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE (tris, borato e EDTA 0,1X), corado com brometo de etídio (0,5µg). Cada amostra (15µL) juntamente com 3µL de tampão da amostra, foi submetida à eletroforese em cuba horizontal, com TBE (0,5X), por 60 minutos (2amp e 90 volts). A visualização dos fragmentos amplificados de DNA foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

Resultados

O protocolo B amplificou o DNA-proviral no sangue de dois animais, enquanto que os protocolos A e C, amplificaram em apenas um. É importante notar que esses dois protocolos detectaram o DNA-proviral em animais diferentes (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos protocolos de extração do DNA-proviral do LVC em sangue.

Animal	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C
1	+	+	-
2	-	+	+
3	-	-	-

O animal 3, embora portador do vírus, não apresentou resultado positivo em nenhum dos protocolos testados, indicando que as técnicas testadas ou não são capazes de detectar 100% das amostras, ou o DNA viral não estava presente no seu sangue. De Andrés et al., (2005) também observaram que a PCR não é capaz de detectar todos os animais portadores do LVC.

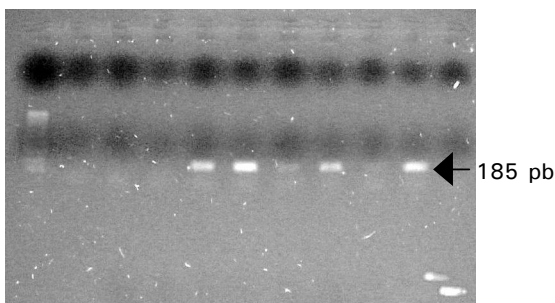


Fig. 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PCR de amostras de sangue, bandas de 185pb, sendo: M- marcador DNA Ladder; 4, 5, 6 e 7 - amostras positivas; 1,2,3 e 8 - amostras negativas; 9 - controle positivo e 10 - controle negativo.

A realização de apenas um teste de IDGA também não é suficiente na detecção do lentivírus caprino. Além disso, foi observado que em amostras de sangue (PCRn) e soro (IDGA) coletadas conjuntamente, ocorriam resultados discordantes nos testes (Andrioli, 2006).

Embora a PCR identifique animais portadores do LVC antes da soroconversão, tem-se relatado que após a soroconversão a PCR é menos sensível quando comparada aos testes sorológicos, de forma que há recomendação que se utilize a associação dos dois testes num programa de controle (De Andrés et al., 2005).

A dificuldade em amplificar o DNA-proviral dos lentivírus pode estar na sua característica de alta taxa de mutação (Suarez & Whetstone, 1997). A variação das seqüências de bases no genoma dos lentivírus afeta a eficiência da PCR, pois esta é intimamente dependente da complementaridade entre os *primers*/ templates (Pasick, 1998). Os LVPR apresentam grande variação antigênica (Ellis *et al.*, 1988) e existem também variações fenotípicas que refletem o potencial patogênico do vírus (Pasick, 1998).

Em continuidade ao experimento, elegeu-se o protocolo de extração B para ser utilizado em sete reprodutores portadores do vírus da AEC, sendo que todas as amostras apresentaram resultados positivos.

Devido à ocorrência de falsos negativos nos testes de IDGA e PCR, indica-se a associação dos dois testes para o controle da AEC.

Para padronizar o protocolo de extração do DNA-proviral do LVC em sangue, é necessário determinar a sensibilidade e a especificidade do teste, além da repetibilidade dos resultados, sendo que essas ações estão sendo realizadas no laboratório de biologia molecular da Embrapa Caprinos.

Agradecimento ao Banco do Nordeste – BNB e à Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa – Funcap, pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MARTINS, A. S.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, D. O. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, DF, v. 41, n. 8, p.1313-1319, 2006.
- BARLOUGH, J., EAST, N., ROWE, J. D. HOOSEAR, K. V.; DEROCK, E.; BIGORNIA, L.; RIMSTAD, E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **Journal of virology methods**, v. 50, p. 101-114, 1994.
- BELÁK, S., BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. **Vet. Research Comm.**, v. 17, n. 1, p. 55-72, 1993.
- CALDAS, A. P. F.; LEAL, E. da S.; SILVA, E. F. A.; RAVAZZOLO, L. A. P. Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia de polimerase. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 20, n.1, 2000.
- CHEEVERS, W. P., KNOWLES, D. P., MCGUIRE, T. C. et al. Chronic disease in goats orally infected with two isolates of the caprine arthritis encephalitis lentivirus. **Lab. Inv.**, v. 58, n. 5, p. 510-517, 1988.
- CLAVIJO, A., THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. **Small Rumin. Res.**, v. 22, p. 69-77, 1996.
- CORK, L. C., HADLOW, W. J., CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R.C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **J. Infec. Dis.**, v. 129, p. 134-141, 1974.
- DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 25, n. 107(1-2), p. 49-62, 2005.
- ELLIS, T. M., ROBINSON, W., WILCOX, G. The pathology and aetiology of lung lesions in goats infected with *caprine arthritis-encephalitis virus*. **Aust. Vet. J.**, v. 65, n. 3, p. 69-73, 1988.
- NARAYAN, O., KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D. GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J. E.. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection and Immunity**, v.

41, p. 67-73, 1983.

PANTELEEFF, D. D.; JOHN, G.; NDUSTI, R.; MBORI-NGACHA, D.; RICHARDSON, B.; KREISS, J.; OVERBAUGH, J. Rapid method for screening dried blood samples on filter paper for human immunodeficiency virus type 1 DNA. **J. Clin Microbiol.**, v. 2, p. 350-353, 1999.

PASICK, J. Maedi-Visna virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct species ou quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. **Can. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 241-244, 1998.

REDDY, P. G., SAPP, W. J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **J. Clin Microb.**, v. 31, n. 11, p.3042-3043, 1993.

RIMSTAD, E., EAST, N., DeROCK, E., HIGGINS, J.; HIGGINS, J.; PEDERSEN, N. C. Detection of antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus using recombinant gag proteins. **Arch. Virol.**, v. 134, p. 345-356, 1994.

RIMSTAD, E., EAST, N.E., TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DeROCK, E.; PEDERSON, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p. 1858-1862, 1993.

SALTARELLI, M., QUERAT, G., KONINGS, D.A.M.; VIGNER, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcription analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology**, v. 179, p. 347-364, 1990.

SUAREZ, D. L., WHETSTONE, C. A. Comparison of different PCR tests to detect bovine lentivirus in cell culture and experimentally and naturally infected cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 9, n. 4, p. 421-424, 1997.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.

**Comunicado
Técnico, 72
On Line**

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145, CEP 62010-970 Sobral, CE

Fone: (0xx88) 3677-7000

Fax: (0xx88) 3677-7055

Home-page: www.cnpc.embrapa.br

E-mail: www.cnpc.embrapa.br/sac.htm

1ª edição **On line** (dez./2006)

**Comitê de
publicações**

Presidente: *Díones Oliveira dos Santos*

Secretária-Executiva: *Luciana Cristine Vasques Villela*

Membros: *Alexandre César Silva Marinho*

Verônica Vasconcelos Freire

Marcelo Renato Alves Araújo

Tânia Maria Chaves Campêlo

Expediente

Supervisor editorial: *Alexandre César Silva Marinho*

Revisão de texto: *José Carlos Mendes Vasconcelos*

Normalização bibliográfica: *Alexandre C. S. Marinho*

Editoração eletrônica: *Alexandre César Silva Marinho*