

DETECÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAEV) PELA IMUNODIFUSÃO EM GEL DE AGAROSE (IDGA) E REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Lídia Maria Marques dos Santos¹, Elmiro Rosendo do Nascimento², Juliana Ferreira de Almeida², Karine de Castro Meirelles³, Roberto Soares de Castro⁴, Virginia Léo de Almeida Pereira²

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal - CMV/Universidade Federal Fluminense - UFF e bolsista CNPq

2. Departamento de Saúde Coletiva Veterinária e Saúde Pública, CMV/UFF. Faculdade de Veterinária: R. Vital Brasil Filho, 64, Vital Brazil . CEP: 24.230-340. Niterói, RJ, Brasil.

E-mail: elmiro@vm.uff.br (autor correspondente)

3. Médica Veterinária, Leopoldina, MG

⁴Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

PALAVRAS-CHAVE: Diagnóstico, doença infecciosa, pequenos ruminantes.

ABSTRACT

DETECTION OF CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS INFECTION BY AGAR GEL IMMUNODIFFUSION AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Caprine arthritis encephalitis (CAE) is a long-lasting, degenerative, fatal disease of high prevalence in goat herds in Brazil. Serologic analysis remains an indispensable means for confirming viral infection, especially by immunodiffusion gel agarose test (IDGA), although other methods might be used, such as polymerase chain reaction (PCR). This study investigates the positivity rate for CAE by PCR in animals previously diagnosed by IDGA. Seropositivity was observed in 25,40% of blood samples (n=63), which were analysed in the Molecular Biology Laboratory at Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense. One of the reactive samples by IDGA was also positive by PCR. The co-positivity between CAE detection by PCR and IDGA was lower. It is reported that after seroconversion, CAE positivity by PCR may decrease when compared to serologic test results. Based on this fact, we recommend using the association between the two tests for development of monitoring programs for CAE control.

KEYWORDS: Diagnosis, goats, infectious disease.

INTRODUÇÃO

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade incurável, degenerativa, com evolução lenta e de alta prevalência nos rebanhos caprinos nacionais (ANDRIOLI et al., 2007). O agente etiológico foi identificado no início da década de oitenta como um RNA-vírus pertencente ao gênero *Lentivirus* da família Retroviridae e subfamília Lentivirinae. Trata-se de uma doença infecciosa dos caprinos, podendo ocorrer também ovinos, que geralmente se apresenta de forma crônica, caracterizada por um longo período de incubação, em que, os animais infectados passam a ser portadores permanentes do vírus. A doença pode se manifestar por quadros clínicos de artrite, encefalite, mastite, pneumonia e emagrecimento crônico (FRANKE, 1998).

O diagnóstico dessa infecção viral é baseado na sorologia, sendo a prova de escolha a imunodifusão em gel de agarose (IDGA), embora outras técnicas para detecção do vírus possam ser utilizadas, tais como o isolamento viral, a hibridização *in situ* e a reação em cadeia da polimerase – PCR (ANDRIOLI et al., 2006).

Embora a IDGA seja a principal forma de detecção de animais infectados pelo CAEV e o teste indicado pela *World Organization for Animal Health* (OIE), possui um valor limitado na identificação de animais em fase inicial da infecção (FROTA et al., 2005). Por isso, para o diagnóstico precoce da enfermidade técnicas moleculares de detecção viral têm sido aplicadas, dentre elas a PCR, cujo objetivo é a amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos, permitindo a obtenção de milhares de cópias de uma sequência específica de DNA (FROTA et al., 2005; ANDRIOLI et al., 2006).

A PCR tem sido utilizada para a pesquisa do DNA proviral dos 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).

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a positividade para CAE por PCR, em animais com resultado positivo pela IDGA.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material

Foram coletadas amostras sanguíneas por venopunção jugular, em 63 caprinos assintomáticos, provenientes de um rebanho do município de Leopoldina, Minas Gerais, Brasil. Para o teste de IDGA o sangue foi transferido para tubos *ependorf* sem anticoagulante e para a PCR em tubos *vacutainer* com anticoagulante EDTA. As amostras

foram acondicionadas sob refrigeração em caixa isotérmica e encaminhadas ao Laboratório de Epidemiologia Molecular da Faculdade de Veterinária – UFF, para diagnóstico da CAE pela IDGA e PCR.

Detecção de anticorpos

As amostras de sangue foram dessoradas em temperatura ambiente e/ou centrifugadas (20.000Xg) por cinco minutos, quando necessário, para a obtenção final dos soros, os quais foram armazenados a -20°C até o momento de uso. Os soros foram submetidos ao teste de IDGA para diagnóstico de CAE, pela utilização de reagente comercial (Kit Biovetech[®], Recife, PE), direcionado à detecção de anticorpos antip28 em soros de caprinos e ovinos.

Após a disposição dos soros suspeitos, dos controles positivos e do antígeno nos respectivos orifícios, as placas foram incubadas em atmosfera úmida à temperatura entre 20°C e 25°C por 48 horas. A presença de uma linha formada entre o antígeno e o soro controle positivo indicou a presença de anticorpos no soro testado e, conseqüentemente, a classificação do animal como positivo.

Detecção do DNA proviral no sangue

A extração do DNA foi realizada a partir do sangue com anticoagulante utilizando-se o “illustra[™] blood genomic Prep Mini Spin Kit” (GE Healthcare[®]) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi estocado em *freezer* a -20°C.

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; ANDRIOLI et al., 2006), sendo os iniciadores P1= 5'CAA GCA GCA GGA GGG AGA AGC TG3' (posição genômica 953-975) e P2= 5'TCC TAC CCC CAT AAT TTG ATC CAC3' (posição genômica 1249-1226) descritos Barlough et al. (1994) que amplificaram um fragmento alvo de 297pb. Em seguida foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores internos P3= 5'GTT CCA GCA ACT GCA AAC AGT AGC AAT G3' (posição genômica 997-1024) e P4= 5'ACC TTT CTG CTT CTT CAT TTA ATT TCC C3' (posição genômica 1181-1154) para a segunda amplificação (Nested PCR) para a obtenção de *amplicon* de 185pb (RIMSTAD et al., 1993; ANDRIOLI et al., 2006). A reação consistiu de um volume total de 50µL e os reagentes obedeceram às concentrações segundo BARLOUGH et al. (1994), contendo: tampão Tris HCl 10mM; KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM; dNTP 100µM de cada; 20 pmol de cada *primer* (ciclo 1: oligos P1 e P2; ciclo 2: oligos P3 e P4); Taq DNA polimerase (2UI); DNA da amostra: 3µL no ciclo 1 e 1µL de produto do ciclo 1 no ciclo 2, sendo o volume final completado com água livre de DNase.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (Thermo Electron Corporation) com as seguintes etapas: um ciclo inicial para desnaturação a 94°C por 5 minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 45 segundos; seguidos de extensão final a 72°C por 7 minutos e término a 4°C.

Os produtos obtidos na PCR, juntamente com o marcador molecular, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de IDGA resultou em 16 amostras positivas das 63 analisadas. Das positivas na sorologia, seis foram submetidas à técnica de PCR, onde uma foi confirmada para infecção pelo CAEV. A discordância dos resultados poderia ser explicada pelo fato do DNA viral não estar presente no sangue dos cinco animais que apresentaram resultado positivo na IDGA (ANDRIOLI et al., 2006). Uma diferente explicação para tais resultados consiste na possibilidade da carga viral ter sido baixa em função dos altos títulos de anticorpos, o que explicaria um número pequeno de células contendo o provírus e diminuindo a possibilidade de detecção pela PCR. Outra possibilidade gira em torno do fato do CAEV não infectar leucócitos, mas sim monócitos, os quais constituem apenas 10% dos leucócitos do sangue periférico e somente nessas células seria detectado o provírus (RUTKOSKI et al., 2001).

Embora a PCR identifique animais portadores dos lentivírus caprinos antes da soroconversão, tem-se relatado que após esta, a PCR apresenta-se menos sensível quando comparada aos testes sorológicos, de forma que há recomendação que se utilize a associação dos dois testes em um programa de monitoramento e controle da enfermidade (DE ANDRÉS et al., 2005; ANDRIOLI et al., 2006).

CONCLUSÃO

A detecção de CAEV pela PCR em animais IDGA positivos para CAE resultou em co-positividade inferior. Resta saber, se em animais negativos à CAE pelo IDGA aumenta a positividade pela PCR.

REFERÊNCIAS

ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA A. M. G.; SOUZA, K. C.; SANTOS, D. O. Controle da artrite encefalite caprina através do uso de tecnologias reprodutivas aplicadas às

fêmeas. **Comunicado Técnico Embrapa**, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/cot86.pdf>>. Acesso em: Out. 2008.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue. **Comunicado Técnico Embrapa**, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/cot72.pdf>>. Acesso em: Jun. 2008.

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 Virological Methods**, Amsterdam, v. 50, p. 101-114, 1994.

CLAVIJO, A., THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 22, p. 69-77, 1996.

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**, Amsterdam, v. 25, n. 107(1-2), p. 49-62, 2005.

FRANKE, C. R. Uma virose emergente ameaça o rebanho caprino nacional: Artrite-encefalite caprina (CAE). **Revista Bahia Agrícola**, Salvador, v. 2, n. 3, 1998.

FROTA, M. N. L.; SILVA, J. B. A.; ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Artrite encefalite caprina em cabritos de rebanhos com programa de controle no Estado do Ceará. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, p. 147-152, 2005.

REDDY, P. G., SAPP, W. J., HENEINE, W. Detection of caprine arthritis-encephalitis virus by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, 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. **Archives of Virology**, New York, v. 134, p. 345-356, 1994.

RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M.; HIGGINS, J.; DeROCK, E.; PEDERSEN, N. C. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus

infectious in goats. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 54, n.11, p. 1858-1862, 1993.

RUTKOSKI, J. K.; WERENICZ, R.; REISCHAK, D.; WENDOLSTEIN, A. C.; MOOJEN, V.; RAVAZZOLO, A. P. Detecção da infecção pelo vírus da artrite-encefalite caprina: imunodifusão em ágar e reação em cadeia da polimerase com “primers” degenerados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 635-640, 2001.

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**, New York, v. 179, p. 347-364, 1990.