

DETECÇÃO DO VIRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA EM AMOSTRAS DE LEITE DE CABRAS PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E NESTED-PCR

CAPRINE ARTHRITIS ENCEPHALITIS VIRUS DETECTED BY PCR AND NESTED-PCR IN MILK

L. GREGORY¹, M. C. C. S. H. LARA², E. M. C. VILLALOBOS², M. Y. HASEGAWA³, R. S. CASTRO⁴, J. N. M. RODRIGUES⁵, J. ARAÚJO⁵, L. W. KELLER⁵, E. L. DURIGON⁶

RESUMO

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença infecciosa multissistêmica causada por um Lentivirus, que pode infectar animais de idade e sexo variados. Os principais sinais clínicos são leucoencefalomielite, pneumonia intersticial crônica, artrite e mastite indurativa intersticial. Foi descrito que cabras infectadas apresentavam endurecimento gradativo e difuso do parênquima glandular e com a presença de vários nódulos de consistência dura, além de apresentarem diminuição na produção leiteira e alterações físico-químicas no leite. O exame de amostras de leite pelas técnicas de PCR e nested-PCR para detecção da CAE é caracterizada como métodos com alta especificidade e sensibilidade, oferecendo resultados rápidos. A técnica possibilita identificar vírus em amostras com vírus não viável. Nesse estudo, 72 amostras de leite de cabras sororreagentes ao teste de imunodifusão em ágar gel (IDGA) foram avaliadas. Utilizou-se para a produção de DNA primers específicos o gene *Pol*. As técnicas de PCR e nested-PCR foram conduzidas para amplificar fragmentos genômicos correspondentes ao gene *Pol*. Catorze amostras (19,4%) apresentaram formação de banda positiva na altura de 600 pb para PCR, e 16 amostras (22,2%) para nested-PCR na altura de 278 pb. Os resultados mostraram que a técnica foi adequada para detectar o DNA pró-viral em amostras de leite e pode ser utilizado como uma ferramenta complementar no estudo da transmissão natural do vírus pela ingestão do leite de cabras sororreagentes a CAE.

PALAVRAS-CHAVE: Artrite encefalite caprina. Vírus. PCR. Nested-PCR. Leite

SUMMARY

The caprine arthritis encephalitis is a multisystemic infectious disease caused by a *Lentivirus* may affect animals at all ages and sex. The major symptoms are leucoencephalomyelitis, cronical interstitial pneumonia, arthritis and hardening interstitial mastitis. It was described that mammary glands from infected goats had a gradual non inflammatory diffuse nodular hardening, and also decreased milk production and abnormal physical-chemical milk parameters. The detection on milk samples by PCR and nested-PCR techniques are characterized as methods with high specificity and sensibility that provides fast results. The techniques are able to identify nucleic acids on samples with no living virus. In this study, 72 milk samples from infected and seroreagent to IDAG test animals were evaluated. DNA generation with specifics primers *Pol* gene, PCR and nested-PCR was conducted for individual amplification from a genomic fragment corresponding to the *Pol* gene. Fourteen samples (19, 4%) presented positive by PCR at 600 bp length bands and 16 samples (22, 2%) by nested-PCR at 278 bp length bands. The results show that PCR and nested-PCR techniques were able to detect pro-viral DNA in goat milk samples and may be used as a complementary means of Caprine Arthritis and Encephalitis diagnosis.

KEY-WORDS: Caprine arthritis encephalitis. Virus. PCR. Nested-PCR. Milk.

¹ Professora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

² Instituto Biológico - APTA - SAA, São Paulo.

³ Pós-graduanda da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

⁴ Professor da Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

⁵ Pós-graduandos do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

⁶ Professor do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. E-mail: gregory@fmvz.usp.br; Endereço: Avenida Professor Orlando Marques de Paiva, 87, São Paulo, S. P., 05508-000, Brasil tel: 55 11 3091 1260 Fax: 55 11 3091 1283.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho caprino significativo no contexto pecuário nacional, com aproximadamente 10.401.449 de cabeças, das quais 93% encontram-se na região Nordeste (IBGE, 2008). Mesmo se tratando de um sistema de criação antigo e não tecnificado, a caprinocultura nacional ainda apresenta uma série de problemas, que dificultam a produção de forma econômica desses animais, por isto necessitam de urgentes soluções, visando minorar os grandes prejuízos que causam a essa produção agropastoril. De fundamental importância dentre esses fatores, destacam-se as enfermidades infecto-contagiosas ainda muito comuns nos rebanhos brasileiros, associadas a outras, ainda consideradas como emergentes. Entre elas merecendo especial destaque, a Artrite-Encefalite dos Caprinos (CAE).

A CAE foi definida como uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, causada por vírus pertencente ao gênero *Lentivirus*, que infecta caprinos de todas as idades, independente do sexo, raça e tipos de exploração econômica (LARA, 2002). A doença é de difícil controle, sobretudo pela indisponibilidade de vacinas e pela sua ampla distribuição em plantéis de excelência zootécnica e grande valor econômico. Os prejuízos decorrentes de qualquer uma das quatro formas clínicas da CAE, tais como artrite crônica (CRAWFORD et al., 1980), mamite intersticial endurativa (SMITH e SHERMAN, 1994, LERONDELLE et al., 1995, SERAKIDES et al., 1996), leucoencefalomielite (CORK et al., 1974) e pneumonia intersticial crônica (SIMS et al., 1983), são consideráveis, principalmente porque encurta a vida produtiva do animal com diminuição gradativa da produção de leite, predispondo a glândula mamária às infecções, causando agalaxia e endurecimento da mama e consequentemente desvalorizando comercialmente os animais de criatórios considerados infectados.

De acordo com PERK (1988), as lesões na glândula mamária de cabras infectadas, natural ou experimentalmente, são de evolução gradativa e difusa com endurecimento do parênquima resultando em assimetria das metades do úbere e diminuição da produção láctea (PERK, 1988, SMITH; CUTLIP, 1988, LERONDELLE et al. 1995, 1999, BIRGEL JUNIOR et al. 2005, LARA et al. 2005). As alterações histopatológicas evidenciaram infiltrações por células mononucleares, por linfoproliferação e hiperplasia dos folículos linfóides podendo evoluir para calcificação e necrose dos alvéolos (GONZÁLES et al., 1987, PERK, 1988, CHEEVERS et al., 1993, GREGORY et al., 2006). Segundo Birgel Junior et al. (2005) e Gregory et al. (2006) a infecção pelo referido vírus também determina alterações na composição físico-química e celular do leite de cabras sororreagentes.

Recentemente, estudos para a detecção do vírus da CAE pela técnica de PCR têm sido realizados em amostras (RIMSTAD et al., 1993, CLAVIJO, THORSEN, 1996, CASTRO et al., 1999, LIMA et al., 2004). Algumas vantagens deste método são a alta sensibilidade e especificidade, a rapidez dos resultados

que podem ser obtidos entre um e dois dias, além da possibilidade de detectar proteínas ou ácido nucléico em amostra na qual o vírus não permanece viável (OIE, 2000).

Desta forma, e tendo em vista a relevância do vírus da CAE como agente causador de doenças em caprinos e de perdas econômicas delas decorrentes, o estudo das técnicas que facilitem o diagnóstico desse agente em animais infectados reveste-se de grande importância. O objetivo deste estudo é detectar, pela técnica molecular PCR e nested-PCR, a presença de DNA pró-viral de lentivírus de pequenos ruminantes em amostras de leite de cabras.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 72 amostras de leite de cabras das raças Saanen, Parda Alpina e Toggenburg sororreagentes ao teste de imunodifusão em ágar gel, provenientes de propriedade leiteiras dos municípios de Ibiúna, Itu, São Bernardo do Campo, São Paulo e Tatuí no Estado de SP. Os animais encontravam-se no período intermediário da lactação, aproximadamente aos 120 dias. As amostras de leite foram colhidas durante a ordenha após a higienização dos tetos com algodão com álcool 70%. As amostras de leite foram acondicionadas em tubos Falcon esterelizados e transportadas em caixa isotérmica com gelo. As amostras de leite foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

O método utilizado de extração do DNA pró-viral das amostras foi o fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). A um volume de 20µL das amostras de leite foram acrescentados 150µL de tampão TNE (Tris HCl 10mM, EDTA 10mM e NaCl 10mM, pH 8,0), 20µL de SDS 10% e 10µL de solução de proteinase K. Após homogeneização e incubação por 30 minutos em banho-maria a 56°C foram feitas três lavagens consecutivas adicionando-se 200µL de fenol (UltraPure™ Buffer-Saturated Phenol - Invitrogen), 150µL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 (UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol - Invitrogen), e 100µL de clorofórmio 100%, respectivamente, cada uma, após agitação e centrifugação das amostras por um período de 4 minutos a 13.500 x g a 18-22°C. O material da extração foi armazenado a -20°C, até sua utilização na amplificação.

Os cDNAs obtidos foram utilizados para amplificação de uma região conservada do gene *pol*, empregando-se primers senso e anti-senso P1 - 5' DSA AGA RAA ATT ARA RGG 3' e P2 - 5'ATC ATC CAT RTA ATA TBC CAA ATT G 3', nas posições 2198 a 2215 e 2672 a 2650 respectivamente, para amplificar fragmentos de tamanhos de 600pb na PCR; e para a segunda amplificação da região mais interna do gene, empregou-se primers senso e anti-senso PN1 - 5'GGA AAD GCA CCY CCA CAT TG 3' e PN2 5'CAT GGT TCC RAY ATT ATT AGG 3' para amplificar fragmentos de tamanhos de 278pb na nested-PCR.

Os cDNAs foram amplificados em um volume total de 50µL contendo 5µL de amostra de DNA, 50mM

KCl, 10mM Tris HCl (pH 8,0), 1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 0,1% Triton X (pH 8,0), 50% glycerol (v/v), 20µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 10µL de cada primer e 1 U de Taq polimerase. Como controle negativo e positivo no lugar da amostra de DNA foi utilizada água DPEC e amostra padrão de DNA pró-viral CAEV Cork derivada de cultivo de células de membrana sinovial caprina infectadas, respectivamente. As amostras foram primeiramente denaturadas a 95°C por 5 minutos e depois submetidas a 35 ciclos de amplificação (Gene Amp® PCR System 9700, Applied Biosystems). Denaturação foi realizada a 95°C por 45 segundos, hibridização a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 8 minutos e as amostras foram mantidas a 4°C até a sua retirada do termociclador. Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (Tris Borato 0,09M, EDTA 0,002M pH 8,0). A corrida eletroforética foi realizada a 80 V e, em seguida, o gel foi corado com de brometo de etídeo, visualizado e registrado em fotodocumentador (BIORAD®). As amostras apresentando fragmentos de 600 e 278pb foram consideradas positivas.

RESULTADOS

Das 72 amostras de leite avaliadas, 14 foram positivas na PCR (19,4%) e 16 foram positivas na nested-PCR (22,2%) (Figura 1). Todas as amostras positivas na nested-PCR também foram positivas na PCR.

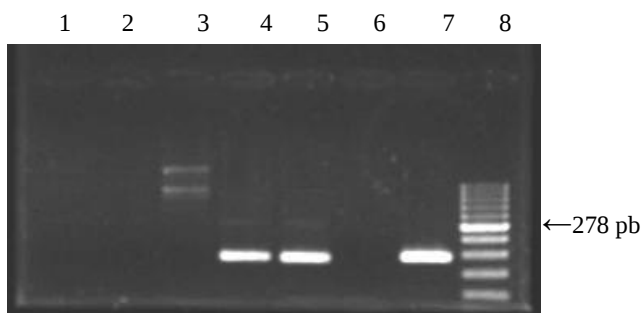


Figura 1 - Eletroforograma de gel de agarose 1,2%, com o resultado da amplificação por nested-PCR do gene *Pol* do CAEV em amostras de leite de cabra. Canaletas 1 a 3: amostras negativas. Canaletas 4 e 5: amostras positivas. Canaleta 6: controle negativo. Canaleta 7: controle. Canaleta 8: peso molecular DNA Ladder 100pb.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A detecção de material genético do vírus de CAE no leite pode sugerir a presença de infecção viral na glândula mamária e apresentar um status de eliminação do vírus por essa via. Esse último fato comprova com mais propriedade as pesquisas com a transmissão que pode ocorrer geralmente por meio da via digestiva com a ingestão de colostro e leite contaminados (PERETZ et al., 1993), que favoreceria a disseminação da infecção viral (ELLIS et al., 1986).

Apesar dos estudos intensos sobre o CAEV, ainda persistem demandas por pesquisas aplicadas, como de pesquisas básicas, que possam fornecer subsídios para o conhecimento do CAEV, sua biologia e relação com o hospedeiro na natureza.

O uso da PCR em rotina de diagnóstico deve atender a certos requisitos básicos, como a rigorosa observância dos procedimentos para evitar falso positivos, o barateamento dos testes e simplificação dos protocolos, além da validação de sua capacidade de amplificar fragmentos conservados do genoma de amostras existentes na população alvo (CASTRO, 1998). Segundo Rimstad et al. (1993) e Chebloune et al., (1996) a PCR tem ainda se apresentado como potencial alternativa na identificação de animais apresentando sinais clínicos da doença com sorologia negativa sem soroconversão. A utilização da PCR pode agregar mais informações quanto ao diagnóstico, porém sempre associado a outras técnicas diagnósticas.

As técnicas de PCR e de nested-PCR, associadas ao protocolo de extração de DNA por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, foram capazes de detectar o vírus da artrite encefalite caprina em amostras de leite de cabras, sendo a nested-PCR mais sensível.

O baixo número de amostras positivas para o CAEV nas amostras avaliadas pode estar relacionado ao congelamento das amostras de leite, que pode ocasionar degeneração do material genético do vírus. Alternativas para aumentar a sensibilidade da técnica com a concentração do vírus foram descritas por Barlough et al. (1994) em que sugerem na extração uma centrifugação em baixa velocidade e uma separação em gradiente de densidade das amostras a fim de obter maior quantidade de DNA pró-viral de fração de células mononucleares.

Mesmo assim, a presença do vírus da CAE em leite pode ter implicações na disseminação e controle da doença. As técnicas de PCR e nested-PCR oferecem uma ferramenta válida para o diagnóstico da CAEV frente ao controle na epidemiologia da doença. Além disto é importante ampliar o conhecimento sobre a manifestação do vírus e suas implicações também em outras enfermidades de espécies diferentes como a proximidade entre o vírus do Maedi Visna em ovinos e também em humanos pela reatividade cruzada com HIV tipo 1 (TESORO-CRUZ et al. 2003 e LOUIE et al. 2003). Por fim, acredita-se que os resultados obtidos podem contribuir para melhorar o entendimento desta doença e ainda auxiliar nas medidas de controle sanitário que podem ser adotadas.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Soares Castro do Laboratório de Virologia da Universidade Rural de Pernambuco, Recife, PE por ceder gentilmente o controle positivo CAEV Cork.

REFERÊNCIAS

- 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 pro-viral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. **Journal of Virological Methods**, v.50, p.101-114, 1994.
- BIRGEL JUNIOR, E. H., CESTARI, V., SAMPAIO, R. M., BIRGEL, D. B., RAIMONDO, R. F., BRANDESPIN, F. B., BIRGEL, E. H. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5., 2005, Búzios – RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: Editora, 2005. (Resumo).
- CASTRO, R. S. Lentivírus de Pequenos Ruminantes: Ensaios Imunoenzimáticos, Perfil Sorológico e Inferências Filogenéticas. 1998. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASTRO, R. S., LEITE, R. C., RESENDE, M., MARTINS, A., GOUVEIA, A. M. G. Isolamento e identificação pela imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da artrite-encefalite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.3, p.235-240, 1999.
- CHEBLOUNE, Y., KARR, B., SHEFFER, D., LEUNG, K., NARAYAN, O. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. **Journal Gen. Virological**, v.77, p.2037-2051, 1996.
- CHEEVERS, W., McGUIRE, T., NORTON, L. K. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. **Virology**, v.196, p.835-839, 1993.
- CLAVIJO, A., THORSEN, J. Application of polymerase chain reaction for the diagnosis of caprine arthritis-encephalitis. **Small Ruminant Research**, v.22, n.1, p.69-77, 1996.
- CORK, L. C., HADLOW, W. J., CRAWFORD, T. B., GORHAM, J. R., PIPER, R. C. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **Journal of Infectious Diseases**, v.129, n.2, p.134-141, 1974.
- CRAWFORD, T. B., ADAMS, D. S., CHEEVERS, W. P., CORK, L. C. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v.207, n.29, p.997-999, 1980.
- ELLIS, T. M., CARMAN, H., ROBINSON, W. F., WILCOX, G. E. The effect of colostrum-derived antibody on neonatal transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.8, p.242-245, 1986.
- GONZALEZ, L., GELABERT, J. L., MARCO, J. C. SAEZ-de-OKARIZ, C. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. **Veterinary Record**, v.120, p.102-109, 1987.
- GREGORY, L., ANGELINI, M., LARA, M. C. C. S. H., BENESI, F. J., RIZZO, H., MAIORKA, P. C., ARAÚJO, W. P., FERNANDES, M. A., KIRALY, A. C. M., BIRGEL JUNIOR, E. H. Clinical evaluation of viral indurative mastitis caused by Caprine Arthritis Encephalitis In: XXIV World Buiatrics Congress. (2006) Nice, France. **Anais of XXIV World Buiatrics Congress**, 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Censo agropecuário. Acesso em 01 Set. 2008. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=73&z=t&o=21>
- LARA, M. C. C. S. H., BIRGEL JUNIOR, E. H., GREGORY, L., BIRGEL, E. H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.57, n.6, p.736-740, 2005.
- LARA, M. C. C. S. H. Artrite-encefalite dos Caprinos – Aspectos clínicos e epidemiológicos. 2002. 247 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, 2002.
- LERONDELLE, C., GODET, M., MORNEX, J. F. Instillation of primary culture of mammary epithelial cells by small ruminant lentiviruses. **Veterinary Research**, v.30, n.5, p.467-74, 1999.
- LERONDELLE, C., GREENLAND, T., JANE, M., MORNEX, J. F. Infection of lactating goats by mammary instillation of cell-borne caprine arthritis-encephalitis virus. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.4, p.850-5, 1995.
- LIMA, P. P., ROCHA, M. A., STANCEK, D., GOUVEIA, A. M. G., OLIVEIRA, G. D. R. Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene gag. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.2, p.135-142, 2004.
- LOUIE, K., DADGARI, J. M., DeBOER, B. M., WEISBUCH, H., SNOW, P. M., CHEEVERS, W. P., DOUVAS, A., McMILLAN, M. Caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats can generate human immunodeficiency virus-gp120 cross-reactive antibodies. **Virology**, v.315, p.217-223, 2003.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. World Organisation for Animal Health. 4th ed. 2000. Acesso em: 03 ago. 2004. Disponível em: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00065.htm.

PERETZ, G., ASSO, J., DEVILLECHAISE, P. Le C.A.E.V.: revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. **Revue de Médecine Vétérinaire** v.144, p.93-98, 1993.

PERK, K. Ungulate lentiviruses: Pathogenesis and relationship to AIDS. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.32, p.97-127, 1988.

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

SERAKIDES, R., NUNES, V. A., PEREIRA, M. F. Estudo clínico, anatomopatológico e imuno-histoquímico de pulmões de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina

(CAE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n.4, p.415-424, 1996.

SIMS, L. D., HALE, C. J., McCORMICK, B. M. Progressive interstitial pneumonia in goats. **Australian Veterinary Journal**, v.60, n.12, p.368-371, 1983.

SMITH, M. C., CUTLIP, R. Effects on infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.193, n.1, p.63-7, 1988.

SMITH, M. C., SHERMAN, D. M. Caprine arthritis encephalitis. **Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.73-79.

TESORO-CRUZ, E., HERNANDEZ-GONZALEZ, R., KRETSCHMER-SCHIMDT, R., AGUILAR-SETIÉN, A. Cross-Reactivity Between Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and Type 1 Human Immunodeficiency Virus. **Archives of Medical Research**, v.34, p.362-366, 2003.