

Introdução

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e o vírus Maedi Visna dos ovinos (MVV) são retrovírus denominados de lentívirus de pequenos ruminantes (SRLV) e estão relacionados biológica, fenotípica e antígenicamente. Embora tenham sido descritos inicialmente como espécie específicos, em rebanhos mistos pode haver a infecção de caprinos por MVV e vice-versa.

Esses vírus desencadeiam processos inflamatórios lentos e progressivos podendo atingir articulações, pulmão, glândula mamária e sistema nervoso. A principal forma de transmissão é através da ingestão de colostro e/ou leite contaminados.

São patógenos que causam redução do bem-estar animal e consideráveis perdas econômicas. A maior parte dos programas de controle e prevenção é de iniciativa voluntária e tem como motivação a possibilidade do uso do *status* de livre da doença como estratégia de *marketing* e aumento na produtividade do rebanho.

O monitoramento geralmente é realizado através de testes sorológicos, como imunodifusão e ELISA. A técnica de PCR para detecção de SRLV tem sido proposta por vários autores, com diferentes genes alvo e tem apresentado resultados variados quanto à capacidade de detecção do vírus. Provavelmente devido à flutuação na carga proviral e às variantes virais circulantes.

Objetivo

O objetivo do projeto é otimizar o diagnóstico de SRLV por PCR, avaliando diferentes métodos de extração de DNA, a fim de definir qual o mais eficiente para os diferentes tipos de amostras (sangue e leite); comparando a eficiência de amplificação de diferentes regiões do genoma proviral (*env* e *gag*) comuns a MVV e CAEV, através de *heminested* PCR e, verificando qual o tipo de amostra (sangue ou leite) é o mais indicado para uso no diagnóstico em questão.

A fim de avaliar a variabilidade das seqüências amplificadas por PCR, utilizaram-se três amostras de origem caprina que apresentaram resultado positivo para o gene *gag* para que fossem caracterizadas através de clonagem e sequenciamento.

Materiais e Métodos

Animais e amostragem

Amostras de sangue e leite foram coletadas em duas propriedades leiteiras (uma de cabras e outra de ovelhas) do estado do Rio Grande do Sul cujo diagnóstico de SRLV dos animais fora confirmado por sorologia.

O sangue foi coletado da veia jugular em tubos a vácuo, os quais foram mantidos sob refrigeração por 12 horas. As amostras de leite foram coletadas minutos antes da ordenha em tubos estéreis diretamente do teto higienizado e mantidos sob refrigeração por 24 horas.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Em um primeiro momento, o material extraído foi submetido a uma PCR para um gene constitutivo (GAPDH) com os *primers forward* e *reverse*, a fim de que se verificasse a eficácia de cada método de extração.

Em seguida, as amostras foram submetidas a *hemi-nested* PCR para os genes *gag* e *env*, com primers e condições específicas para cada reação.

Os produtos da PCR foram analisados, após eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador, sob luz UV.

Extração do DNA

Com a finalidade de obter um número maior de células mononucleares provenientes do sangue e do leite, ambos materiais biológicos foram submetidos a centrifugações. Ao final desse processo, com uma maior concentração dessas células por mL, esse material foi submetido aos diferentes métodos de extração.

O DNA de todas as amostras foi extraído por três métodos de extração diferentes: Sílica, FTA® e DNAzol®, sendo que o método de Sílica foi realizado segundo Boom *et al.* (1990) e os outros dois métodos segundo recomendações do fabricante.

Clonagem e sequenciamento

A partir do *pool* do DNA purificado de três amostras de origem caprina que apresentaram resultado positivo para o gene *gag* foi feita a ligação a um vetor plasmidial (TOPO TA Cloning®, Invitrogen).

Posteriormente bactérias competentes foram transformadas e após o período de multiplicação bacteriana, quatro colônias foram isoladas e submetidas ao processo de extração do DNA plasmidial (Invisorb® Spin Plasmid Mini Two, Invitex).

O DNA plasmidial foi encaminhado ao processo de sequenciamento (ACTGene – Análises Moleculares) para que a seqüência de DNA clonada fosse caracterizada.

As seqüências obtidas foram submetidas ao BLAST (NCBI) e analisadas com o auxílio dos programas Mega e Bioedit.

Resultados e Discussão

Os resultados parciais não demonstraram maior eficiência de detecção quanto à utilização de *primers* para *gag* ou *env*, pois o número de amostras detectadas pelos dois genes alvo foi o mesmo.

Com relação ao método de extração de DNA e ao material biológico, notamos que, de modo geral, o percentual de amplificação das amostras de sangue foi superior ao das de leite e que o método de DNAzol® apresentou o melhor desempenho (Tabela 1).

Quanto à caracterização por sequenciamento do DNA viral, a partir dos fragmentos de PCR *gag* positiva, verificou-se que todas as seqüências obtidas de amostras caprinas apresentaram similaridade com seqüências de SRLVs quando submetidas ao BLAST. Comparando-se as seqüências prováveis de aminoácidos com o protótipo CAEV-CORK (Figura 1), observou-se a presença de sete aminoácidos distintos no fragmento analisado. Este fato poderia influenciar no diagnóstico sorológico quando utilizados antígenos diferentes dos encontrados nas variantes locais.

Tabela 1 - Resultados da PCR para GAPDH como avaliação da extração de DNA genômico de amostras de sangue e leite pelos três métodos

Método de extração	Sangue		Leite	
	Nº de Amostras	PCR* (%)	Nº de amostras	PCR* (%)
DNAzol®	27 _{Ovinas}	62,90	32 _{Ovinas}	31,25
	12 _{Caprinas}	91,66	10 _{Caprinas}	90,00
FTA®	36 _{Ovinas}	8,33	36 _{Ovinas}	19,44
	12 _{Caprinas}	75,00	10 _{Caprinas}	50,00
Sílica	30 _{Ovinas}	83,33	26 _{Ovinas}	38,46
	12 _{Caprinas}	41,70	10 _{Caprinas}	60,00

*Percentuais de amostras analisadas positivas para a amplificação do gene GAPDH

Figura 1 – Alinhamento das seqüências de aminoácidos prováveis correspondentes aos fragmentos de nucleotídeos sequenciados

