

EXTRAÇÃO DE DNA-PROVIRAL E AMPLIFICAÇÃO ATRAVÉS DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DO LENTIVÍRUS CAPRINO EM AMOSTRAS DE SANGUE

ALICE ANDRIOLI¹; KELMA COSTA DE SOUZA²; RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO¹; FABIANE MARIA LIMA SOUSA²

ABSTRACT: ANDRIOLI A.; SOUZA, K. C.; PINHEIRO, R.R.; SOUSA, F.L.M. Extraction of DNA-proviral and PCR of the goat lentivirus in blood samples. The Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) is a chronic disease, caused by lentivirus. Development of PCR assays allowed the inquiry of different biological samples even when DNA is present in small amounts. The objective of this work was to compare and to standardize an efficient method of extration of the proviral DNA of caprine lentivirus (LVC) in blood samples for the use of PCR techniques. Ten male goats had been evaluated, all of them were positive for lentivirus infection by agar gel immunediffusion test (AGID). Protocols were divided into three and classified as, PA, PB and PC. PB extraction assay achieves the amplification of DNA-proviral in the blood of two animals, while protocols PA and PC, amplified only one blood sample. It is interesting to notice that these two protocols had detected the DNA-proviral in different animals.

KEY WORDS: Lentivirus, PCR, Goat

INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (AEC), causada pelo lentivírus caprino (LVC), é uma enfermidade crônica incurável e multisistêmica¹. Para o controle efetivo desta 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. Desta forma, a manutenção de animais falso-negativos no rebanho representa sérios problemas sanitários, dificultando o controle da doença. Devido à confiabilidade e à facilidade na coleta das amostras, os testes para detecção de anticorpos, 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 imune², normalmente há, 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 e até nutricional. Nos testes de IDGA, a reação positiva só ocorre num nível determinado de anticorpos, capaz de formar uma linha de precipitação visível, 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, a qual é adotada na pesquisa de microrganismos devido à sua especificidade, sensibilidade e rapidez de resultados³. Dentre as várias doenças virais de importância veterinária já detectada por PCR, estão as lentivirose de pequenos ruminantes (LVPR)⁴. 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^{5,6,7,8,9}. No caso dos LVPR, esta técnica é particularmente importante para a identificação de animais que apresentam soroconversão tardia ou com resultado sorológico duvidoso¹⁰. Porém, parece não haver relação entre o nível de anticorpos e o resultado positivo à PCR⁷ e nem todas as amostras de sangue positivas aos testes sorológicos são também positivas na PCR⁵. A detecção do DNA proviral por PCR possui alta sensibilidade, sendo capaz de identificar o vírus em uma célula infectada dentro de uma cultura contendo 10⁶ células. Foi observado que uma amostra com três mil monócitos contendo de 30 a 240 células infectadas foi suficiente para gerar resultados positivos na PCR⁷. Parece que a taxa de infecção dos monócitos varia entre indivíduos portadores da AEC, provavelmente devido ao nível de restrição da expressão viral¹¹. O objetivo deste trabalho foi padronizar um método eficaz de extração do DNA-proviral do LVC em amostras de sangue para realização do PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi coletado sangue, em tubos vacuntainer de 5ml com EDTA, de dez machos caprinos, da raça Anglo Nubiana, com sorologia positiva ao teste de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). Em seguida as amostras de sangue foram processadas, segundo três protocolos de extração: Protocolo A (PA)¹², protocolo (PB)¹³ e protocolo (PC)¹⁴. No PA, 5µl de sangue foi adicionado a 1ml de água destilada MilliQ, seguida de homogeneização e centrifugação (1500g) por

* Apoio financeiro da Funcap e BNB.

¹ Pesquisador Doutor, Embrapa Caprinos, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4, Zona Rural, CEP 62011-970 Sobral, CE. E-mail: alice@cnpq.embrapa.br

² Acadêmica do curso de Zootecnia – Universidade Vale do Acaraú – UVA, bolsista Embrapa/CNPq

três minutos. Colocou-se 200µl de Chelex à 5% ao pellet e incubou-se as amostras à 56°C por 30 minutos e 95°C, por oito minutos. Após centrifugação (1500g) por três minutos, as amostras foram armazenadas entre 2 e 8°C. No PB, 5ml de sangue foi centrifugado por seis minutos (4000g) a fim de isolar a capa de leucócitos. Adicionou-se 100µl de leucócitos em 500µl de tris EDTA, pH 8. Centrifugou-se novamente, obtendo-se um pellet ao qual foi adicionado 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). Incubou-se as amostras à 56°C por 45 minutos e 95°C, e após 10 minutos as amostras foram armazenadas entre 2 e 8°C. No PC, 5ml de sangue foi centrifugado por seis minutos (4000g), a capa de leucócitos foi lavada em PBS à 1100Xg à 4°C, por 5 minutos. O pellet foi ressuspenso em 1,5mL de PBS e repetimos a centrifugação. Ao pellet adicionamos 100µL 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). Incubou-se à 56°C por 90 minutos e à 95°C por 20 minutos. Após esta etapa centrifugamos as amostras a 1,000g à 4°C, por 7 minutos e conservamos as amostras à 20°C negativos. Na amplificação do DNA, foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, determinados a partir da região gag da amostra padrão CAEV-Cork¹⁵ sendo os iniciadores P1 = 5'CAAGC AGCAGGAGGGAGAAGCTG3' (posição genômica 953-975) e P2 = 5'-TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC3' (posição genômica 1249-1226), descritos por⁷ 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 pb¹⁰. A reação de PCR Nested (PCR_n) 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 (PTC-100), com os seguintes termos: 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, 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/90volts). A visualização dos fragmentos de DNA foi feita em transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PB amplificou o DNA-proviral no sangue de dois animais, enquanto que os protocolos PA e PC, amplificaram em apenas um (Figura 1). É interessante notar que estes dois protocolos detectaram o DNA-proviral em animais diferentes (tabela 1). 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 sangue¹⁶. A realização de apenas um teste de IDGA também pode não ser suficiente na detecção do lentivírus caprino. Foi observado que em amostras de sangue (PCR_n) e soro (IDGA) coletadas conjuntamente, ocorriam, resultados discordantes nos testes⁹. 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 controle¹⁶. A dificuldade em amplificar o DNA-proviral dos lentivírus pode estar na sua característica de alta taxa de mutação¹⁷. 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*/templates¹⁸. Os LVPR apresentam grande variação antigênica¹⁹ e existem também variações fenotípicas que refletem o potencial patogênico do vírus¹⁸. Em continuidade ao experimento, elegeu-se o protocolo de extração PB para ser utilizado em sete reprodutores portadores do vírus da AEC, sendo que todas as amostras apresentaram resultados positivos. Concluiu-se que o protocolo de extração PB foi satisfatório para a obtenção de DNA pro-viral do lentivírus caprino em amostras de sangue. No entanto, 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 reprodutibilidade dos resultados, sendo que estas ações estão sendo realizadas no laboratório de biologia molecular da Embrapa Caprinos.

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

animal	protocolo A	protocolo B	protocolo C
1	+	+	-
2	-	+	+
3	-	-	-

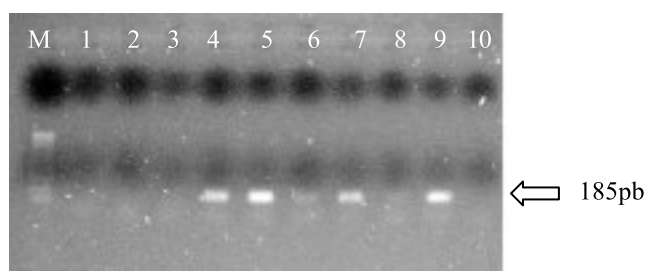


Figura 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. PCR de amostras de sangue, bandas de 185pb, sendo: M- marcador DNA Ladder; 4, 5, 6 e 7 – amostras positivas; 1,2,3 e 8 - amostras negativas; 9 - controle positivo e 10 - controle negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B. et al. *J. Infec. Dis.*, **129**: 134-141, 1974.
- CHEEVERS, W.P., KNOWLES, D.P., McGUIRE, T. C. et al. *Lab. Inv.*, **58** (5):510-517, 1988.
- BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. *Vet. Research Comm.*, **17** (1): 55-72, 1993.
- ZANONI, R.; PAULI, U.; PETERHANS, E. *Experientia*, **46**:360-318, 1990.
- REDDY, P.G.; SAPP, W.J.; HENEINE, W. *J. Clin Microb.*, **31** (11): 3042-3043, 1993.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.; DeROCK, E.; HIGGINS, J. et al. *Arch. Virol.*, **134**:345-356, 1994.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D. et al. *J. Virol. Met.*, **50**: 101-114, 1994.
- CLAVIJO, A.; THORSEN, J. *Small Rumin. Res.*, **22**: 69-77, 1996.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; MARTINS, A.S.; PINHEIRO, R.R.; SANTOS, D.O. *Pesq. Agropec. Bras.* **41** (8) 1313-1319, 2006.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M. et al. *Am. J. Vet. Res.*, **54** (11): 1858-1862, 1993.
- NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S., SHEFFER, D. et al. *Infection and Immunity*, **41**: 67-73, 1983.
- WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. *Biotechniques*, **10** (4):.506-513, 1991.
- CALDAS, A.P.F. et al Detecção do provírus da imunodeficiência felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia de polimerase. *Pesq. Vet. Bras.*, **20** (1), 2000.
- PANTELEEFF, D. D.; JOHN, G.; NDUSTI, R.; MBORI-NGACHA, D.; RICHARDSON, B.; KREISS, J.; OVERBAUGH, J. *J Clin Microbiol.*, **2** 350-353, 1999.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D.A.M. et al. *Virology*, **179** :347-364, 1990.
- DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N.J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B.A.; HARKISS, G.D. *Vet. Microbiol.*, **25** (107): 49-62, 2005.
- SUAREZ, D.L.; WHETSTONE, C.A. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9** (4): 421-424, 1997.
- PASICK, J. *Can. J. Vet. Res.*, **62** :241-244, 1998.
- ELLIS, T.M.; ROBINSON, W.; WILCOX, G. *Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. Aust. Vet. J.*, **65** (3): 69-73, 1988.