



## Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina em pulmão, glândula mamária, cérebro e líquido sinovial de cabras naturalmente infectadas pela técnica de nested-PCR

(Detection of Caprine Arthritis Encephalitis virus in the lung, mammary gland, brain and synovial fluid in naturally infected goats by nested-PCR)

### "Artigo Científico/Scientific Article"

Gregory L.<sup>1</sup>, Lara M.C.C.S.H.<sup>2</sup>, Hasegawa M.Y.<sup>3</sup>, Castro R.S.<sup>4</sup>, Fatini L.C.<sup>5</sup>, Gaeta N.C.<sup>5</sup>, Rodrigues J.N.M.<sup>6</sup>, Araújo J.<sup>6</sup>, Keller L.W.<sup>6</sup>, Durigon E.L.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo

<sup>2</sup>Instituto Biológico - APTA - SAA, São Paulo;

<sup>3</sup> Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo;

<sup>4</sup> Professor da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife;

<sup>5</sup> graduandas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo;

<sup>6</sup> Pós-Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo;

<sup>7</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

#### Resumo

A artrite encefalite caprina é uma doença infecciosa multissistêmica causada por um Lentivírus. Os principais sinais clínicos são leucoencefalomielite, pneumonia intersticial crônica, artrite e mastite indurativa intersticial. Alguns animais podem ser diagnosticados como negativos quando submetidos a testes sorológicos na fase inicial da doença. Nesses casos o teste molecular da nested-PCR apresenta-se como uma técnica diagnóstica confiável. Neste estudo 33 amostras de tecidos de cérebro, pulmão, glândula mamária e duas amostras de líquido sinovial provenientes de 12 animais da espécie caprina com artrite e mastite indurativa foram analisadas pela técnica de nested-PCR para a detecção do vírus da CAE. O resultado do cDNA foi obtido através da amplificação do gene *pol*. Em duas amostras de cérebro, uma de pulmão, duas de glândula mamária e duas de líquido sinovial de quatro animais, foram detectadas a presença do cDNA viral.

Palavras-chave: CAE, diagnóstico, órgãos, reação em cadeia da polimerase

#### Abstract

The caprine arthritis encephalitis is a multisystemic infectious disease caused by a *Lentivirus*. The major symptoms are leucoencephalomyelitis, chronic interstitial pneumonia, arthritis and hardening interstitial mastitis. Some animals may be diagnosed negatives when submitted to serological tests in the early phases of the disease. On these cases nested-PCR test presents itself as a reliable diagnostic technique. In this study, 33 tissue samples from brain, lungs and mammary glands and two samples of synovial fluid taken from 12 animals presenting arthritis or mastitis, were submitted to nested-PCR. The resultant cDNA was used to the *pol* gene amplification. Two brain samples, one lung sample, two mammary gland samples and two synovial fluid samples from four animals produced visible positive bands at the ethidium bromide stained agarose gel.

Keywords: CAE, diagnosis, organs, polymerase chain reaction

#### Introdução

O Brasil possui um rebanho caprino significativo no contexto pecuário nacional, com aproximadamente 9 164 421 de cabeças, sendo que 90,6% encontram-se na região nordeste (IBGE, 2009). Mesmo se tratando de um sistema de criação muito antigo em nosso país, a caprinocultura, ainda apresenta uma série de problemas, que dificultam a produção econômica desses animais e 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, atualmente, destaque, a Artrite-Encefalite dos Caprinos (CAE). A CAE foi definida como uma enfermidade infecciosa, multissistêmica, causada por um vírus pertencente ao gênero *Lentivirus*, família *Retroviridae*, que infecta caprinos de todas as idades, independente do sexo, raça e tipos de produção econômica (LARA, 2005).

A doença é de difícil controle, sobretudo pela indisponibilidade de vacinas e pela sua econômico. Os prejuízos econômicos decorrentes ampla distribuição em plantéis de excelente

<sup>1</sup>Autor para correspondência/Corresponding author (lgregory@usp.br)

<sup>6</sup>Recebido 06/10/2009 e aceito em 22/12/2009.

qualidade zootécnica e grande valor econômico. Os prejuízos econômicos decorrentes de qualquer uma das quatro formas clínicas da CAE foram considerados significativos, principalmente pela diminuição do período de vida produtiva do animal, diminuição gradativa da produção de leite, predispondo a glândula mamária às infecções, causando agalaxia e endurecimento da mama, desvalorizando comercialmente os animais de criatórios considerados infectados.

As lesões em diversos tecidos como pulmão, líquido sinovial, cérebro e glândula mamária de cabras infectadas, natural ou experimentalmente, são descritas pela evolução gradativa da doença nestes locais. Entretanto em locais onde não há favorecimento da transcrição viral, a célula do hospedeiro permanece latentemente infectada, porém sem a manifestação patológica viral (ANGELOPOULOU et al., 2008). As alterações histopatológicas na glândula mamária evidenciaram infiltrações perivasculares por células mononucleares, por linfoproliferação e hiperplasia dos folículos linfóides que muitas vezes evoluem para calcificação e necrose dos alvéolos (GONZÁLES et al., 1987; PERK, 1988; CHEEVERS et al., 1993; GREGORY et al. 2006).

Estudos para a detecção do vírus da CAE pela técnica de PCR têm sido realizados em amostras clínicas (ELTAHIR et al., 2006; 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, 2009). Desta forma, tendo em vista a relevância do vírus da CAE (CAEV) como agente causador de enfermidade multissistêmica em caprinos e de perdas econômicas delas decorrente, o estudo das técnicas que facilitem o diagnóstico desse microrganismo reveste-se de grande importância. O objetivo deste estudo é detectar, pela técnica molecular nested-PCR, a presença de DNA pró-viral do vírus da CAE em amostras de órgãos e líquido sinovial de cabras infectadas naturalmente com ou sem sintomas da enfermidade.

### Material e Métodos

O experimento está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da

“Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo protocolado sob o nº 1326/08 e foi aprovado “ad referendum”.

Para a pesquisa de DNA pró-viral (cDNA) através da amplificação do gene *pol* foram utilizadas 33 amostras de tecido cerebral, pulmonar e mamário, e duas amostras de líquido sinovial provenientes de 12 cabras soropositivas para CAE que apresentavam ou não artrite ou mastite.

O método utilizado para extração do cDNA das amostras de líquido sinovial e órgãos foi o fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Os fragmentos dos referidos órgãos foram pesados e macerados separadamente dois gramas e realizada a suspensão a 20% com PBS anterior a extração. Foram incubados 20µL de amostra por 30 minutos a 56°C, em 150µL de TNE (Tris HCl 10mM, EDTA 10mM e NaCl 10mM, pH 8,0) acrescidos de 20µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e 10µL de pK (Proteinase K). A extração constituiu na realização de três lavagens consecutivas com UltraPure™ Buffer-Saturated Phenol (Invitrogen), UltraPure™ Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol (25:24:1) (Invitrogen) e Clorofórmio 100% respectivamente, centrifugadas a 12000 g por quatro minutos cada em temperatura entre 18°C e 22°C. O produto da extração foi armazenado a -20°C, até sua utilização no nested-PCR. O controle negativo foi feito com água DEPC enquanto que o controle positivo, realizado com amostra padrão de DNA pró-viral CAEV Cork derivada de cultivo de células de membrana sinovial de caprino infectado.

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 TAT BCC AAA TT G 3', onde B = C, G ou T; D = A, G ou T; R = A ou G; e S = C ou G), nas posições 2198 - 2215 e 2672 - 2650 respectivamente, para amplificar fragmentos de tamanhos de 475pb na PCR (LEROUX et al., 1995); 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' CCT AAT AAT RTY GGA CCA TG 3' onde D = G, A ou T; Y = C ou T; e R = A ou G) para amplificar fragmentos de tamanhos de 278pb na nested-PCR. Os primers foram sintetizados no DNA synthesizer (Life Technologies, Inc. Gibco BRL, University of Kentucky, CA, USA).

As reações de amplificação dos cDNAs foram realizadas no termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) em um volume total de 50µL contendo uma mistura de reagentes

(50mM KCl; 10mM Tris HCl (pH 8,0); 1mM EDTA; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton X (pH 8,0); 50% glycerol (v/v); 20µM cada dATP, dGTP, dTTP e dCTP; e 1U de Taq Polymerase). Os primers foram usados a uma concentração de 10µM cada. As amostras foram primeiramente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e depois sujeitas a 35 ciclos de amplificação. Desnaturação 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% com tampão TBE (Tris Borato 0,09M e EDTA 0,002M pH 8,0), corados com brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta com o auxílio de transiluminador e registrado fotograficamente com auxílio do fotodocumentador (BIORAD®). A corrida eletroforética foi desenvolvida a 80V.

## Resultados

A detecção do cDNA foi possível em duas amostras de cérebro (amostras 09 e 107), duas de glândula mamária (amostras 10 e 103), duas de líquido sinovial (amostras 07 e 177) e uma de pulmão (amostra 08) de um total de 33 amostras analisadas pela técnica de nested-PCR. Na figura 1 a imagem do gel de agarose apresenta a formação de banda positiva no tamanho esperado para nested-PCR para as amostras de líquido sinovial (amostra 07), pulmão (amostra 08), cérebro (amostra 09) glândula mamária (amostra 10). Na Figura 2 a imagem do gel de agarose apresenta a formação da banda positiva no tamanho esperado para nested-PCR para as amostras de glândula mamária (amostra 103) e cérebro (amostra 107).

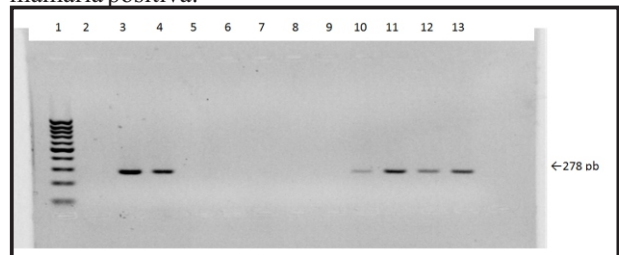
## Discussão e Conclusão

Embora haja estudos intensos sobre o CAEV, ainda persistem demandas por pesquisas aplicadas, como o desenvolvimento de protocolos de técnicas de diagnóstico mais eficientes, bem como de pesquisas básicas, que possam fornecer subsídios para o conhecimento do CAEV, sua biologia e relação com o hospedeiro na natureza.

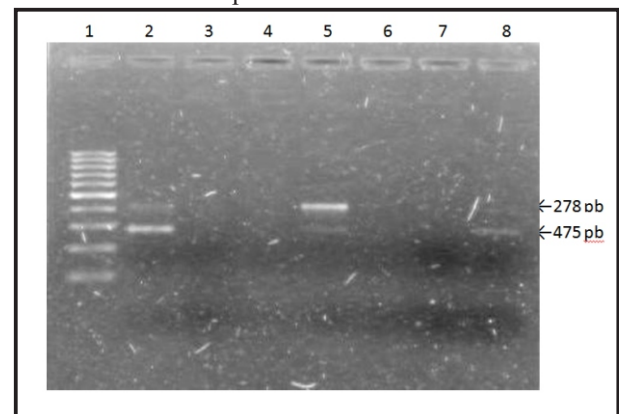
O uso da PCR em rotina de diagnóstico deve atender a certos requisitos básicos, como a rigorosa observância dos procedimentos para evitar falsos

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 et al., 1998).

**Figura 1:** Eletroforese em gel agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Orifício 1: padrão de peso molecular de 100 pb DNA Ladder. Orifício 2: controle negativo. Orifícios 3 e 4: controle positivo, 278 pb (nested-PCR) (amostra padrão CAEV Cork). Orifícios 5 a 9: amostras negativas. Orifício 10: amostra 07 líquido sinovial positiva. Orifício 11: amostra 08 pulmão positiva. Orifício 12: amostra 09 cérebro positiva. Orifício 13: amostra 10 glândula mamária positiva.



**Figura 2:** Eletroforese em gel agarose 1,2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Orifício 1: padrão de peso molecular de 100pb DNA Ladder. Orifício 2: controle positivo 475pb e 278pb (nested-PCR) (amostra padrão CAEV Cork). Orifício 3: controle negativo água DEPEC. Orifício 4: amostra negativa. Orifício 5: amostra 103 glândula mamária positiva. Orifício 6 e 7: amostras negativas. Orifício 8: amostra 107 cérebro positiva.



Segundo Rimstad et al. (1993) e Chebloune et al. (1996) a PCR tem ainda se apresentado como potencial alternativa na identificação de animais com sorologia negativa ou dúbia. A utilização da PCR pode agregar mais informações quanto ao diagnóstico, porém sempre associado a outras técnicas diagnósticas. Por exemplo, em um programa de erradicação da doença num rebanho, a PCR pode ser utilizada para testar animais soronegativos. Em programas de reprodução, a PCR pode ser utilizada para testar amostras de sangue ou



sêmen de reprodutores negativos ao teste ELISA (ANDRÉS et al., 2005).

Vários protocolos de PCR foram desenvolvidos para detectar o DNA pró-viral. Estas metodologias incluem PCR multiplex em diferentes regiões, semi-nested PCR (ELTAHIR et al., 2006), double-nested PCR (BARLOUGH et al., 1994), nested PCR (GREGORY et al., 2009), real time PCR e real time RT-PCR (RAVAZZOLO et al., 2006) ou combinações de ambos procedimentos que é uma técnica mais sofisticada, embora o PCR tende a ser uma técnica menos sensível que a técnica de ELISA devido a baixa carga viral na fase após a soroconversão no animal, porém consegue-se detectar animais infectados antes da soroconversão (ANDRÉS et al., 2005).

Também se deve afirmar que há sucesso com esta técnica de detectar o vírus ou parte dele na sua grande diversidade de variação (ZHANG et al., 2000). Um método que seja altamente sensível, específico e capaz de detectar todas as variantes do vírus mesmo presente em baixa concentração, são pré-requisitos fundamentais para o sucesso do controle e erradicação das lentivirose (PEPIN et al., 1998).

Para confirmar a amplificação de parte do gene pol do vírus da CAE, foram sequenciadas e disponibilizadas no GenBank as amostras de líquido sinovial 07 e 177 (HQ696616 e HQ696631), de pulmão 08 (HQ696617), de cérebro 09 e 107 (HQ696618 e HQ696625) e de glândula mamária 10 e 103 (HQ696619 e HQ696624), respectivamente. Portanto, pode-se afirmar que as bandas positivas localizadas na altura de 475pb e 278pb confirmam a adequação do nested-PCR respectivamente para detectar o CAEV em amostras de órgãos e líquido sinovial de caprinos infectados pelo referido vírus. Com relação à técnica utilizada observou-se grande sensibilidade na técnica de nested-PCR por amplificar uma região mais interna no produto do PCR concordando com Gil et al. (2006) e Gregory et al. (2009).

Pode-se suspeitar de que o processo de armazenamento das amostras de órgãos dos animais em freezer a -20°C tenha contribuído para a grande negatividade diagnóstica encontrada já que é possível a degeneração do material genético do vírus, tornando-o inviável. Segundo Angelopoulou et al. (2008) alguns animais infectados com o vírus Maedi Visna não apresentavam sinais clínicos nem a presença do DNA pró-viral nos órgãos alvo; sugerindo uma patogenicidade reduzida causada em parte por uma deleção específica da região R do genoma viral. Pode-se talvez levantar a mesma hipótese de que os animais apresentassem infecção por uma estirpe viral com patogenicidade reduzida e,

portanto resultado negativo à técnica utilizada, necessitando assim, maiores estudos nesse sentido para averiguar se a deleção e a patogenicidade reduzida ocorre também com o vírus da CAE. Clements e Zink (1996) também referem que mesmo quando o DNA viral está integrado ao genoma celular, à célula pode permanecer tanto latentemente infectada com pouca ou nenhuma expressão viral ou ativamente infectada produzindo partículas virais.

A presença do vírus da CAE em órgãos pode ter implicações na disseminação e controle da doença. O mais importante é aumentar o conhecimento sobre a manifestação do vírus em geral, na espécie ovina, (LEROUX et al., 1995), sua proximidade entre o vírus Maedi Visna infectando caprinos (CASTRO et al., 1999) e também em humanos pela reatividade cruzada com HIV tipo 1 (TESORO-CRUZ et al., 2003 e LOUIE et al., 2003). Através da detecção por PCR e nested-PCR nos órgãos estudados e líquido sinovial provou-se a presença nestas regiões do vírus da Artrite e Encefalite Caprina onde as formas clínicas da enfermidade são desenvolvidas: artrite crônica, pneumonia progressiva aguda, mamite indurativa e leucoencefalomielite.

## Referências

- ANDRÉS, D. et al. Diagnostic tests for small ruminants lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 49–62, 2005.
- ANGELOPOULOU, K. et al. A deletion in the R region of long terminal repeats in small ruminant lentiviruses is associated with decreased pathology in the lung. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 346–355, 2008.
- BARLOUGH, J. et al. 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**, v. 50, p. 101-114, 1994.
- CASTRO, R.S. et al. 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, 1998.
- CHEBLOUNE, Y. et al. Variation in lentiviral gene expression in monocyte-derived macrophages from naturally infected sheep. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 2037-2051, 1996.

- CHEEVERS, W. et al. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. **Virology**, v. 196, p. 835-839, 1993.
- CLEMENTS, J.E.; ZINK, M.C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, p. 100-117, 1996.
- ELTAHIR, Y.M. et al. Development of a semi-nested PCR using degenerate primers for the generic detection of small ruminant lentivirus proviral DNA. **Journal of Virological Methods**, v. 135 p. 240–246, 2006.
- GIL, A; ROLA, M; KUŹMAK, J. Application of PCR technique in diagnosis of small ruminant lentivirus infection in sheep and goats. *Pol J Vet Sci*. 9(4):213-7; 2006.
- 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. et al. Clinical evaluation of viral indurative mastitis caused by Caprine Arthritis Encephalitis In: XXIV WORLD BUIATRICS CONGRESS, 24<sup>TH</sup>. 2006. Nice. **Proceedings... XXIV World Buiatrics Congress, 2006. CD-ROOM**.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, 2009 - [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas\\_pdf/tab04.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab04.pdf) Acesso em 07 Junho de 2011. LARA, M.C.C.S.H. et al. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 736-740, 2005.
- LEROUX, C. et al. Genomic heterogeneity in the *pol* region of ovine lentiviruses obtained from bronchoalveolar cells of infected sheep from France. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1533-1537, 1995.
- LIMA, P.P. et al. 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. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats can generate human immunodeficiency virus-gp120 cross-reactive antibodies. **Virology**, v. 315, n. 1, p. 217–223, 2003.
- OIE. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. World Organisation for Animal Health. 4<sup>th</sup> ed. 2000. Disponível em: <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00065.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00065.htm)>, Acesso em: 03 ago. 2004.
- PEPIN, M. et al. Maedi-visna virus infection in sheep: A review. **Veterinary Research**, v. 29, n. 3-4, p. 341-367, 1998.
- PERK, K. Ungulate lentiviruses: Pathogenesis and relationship to AIDS. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 32, p. 97-127, 1988.
- RAVAZZOLO, AP; NENCI C; VOGT, HR; WALDVOGEL, A; OBEXER-RUFF, G; PETERHANS, E; BERTONI, G. Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. **Virology**. 20;350(1):116-27. Jun. 2006.
- RIMSTAD, E. et al. 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.
- TESORO-CRUZ, E. et al. A Cross-Reactivity Between Caprine Arthritis-Encephalitis Virus and Type 1 Human Immunodeficiency Virus. **Archives of Medical Research**, v. 34, p. 362–366, 2003.
- ZHANG, Z. et al. Quantitative analysis of maedi-visna virus DNA load in peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Journal of Virological Methods**, v. 86, p. 13–20, 2000.