

On line

Metodologia Científica: Processamento de líquido céfalo-raquidiano para extração de RNA genômico do vírus da artrite-encefalite caprina e diagnóstico molecular por RT-nested PCR

Lucia Helena Sider¹
Roberta Lomonte Lemos de Brito²
Ana Kamila Andrade Veras³
Apoliana S Rodrigues⁴
Kelma Costa de Souza⁵
Eduardo Luis de Oliveira⁶
Alice Andrioli¹
Raymundo Rizaldo Pinheiro¹

A artrite-encefalite caprina (CAE) é uma doença multissistêmica, crônica e debilitante causada por um retrovírus do gênero *Lentiviridae*. Ela tem sido reportada em caprinos de várias raças, sexos e idades (CORK et al., 1974). A principal via de transmissão do vírus é a ingestão de colostro e/ou leite de cabras infectadas (revisado por BLACKLAWS et al., 2004). Muitas vezes, os cabritos mantêm o hábito de mamar em diversas cabras, inclusive na sua própria mãe. Além da via digestiva, o contato direto também deve ser considerado como fonte de infecção (EAST et al., 1993). Recentemente, Souza (2010) comprovou a transmissão do vírus da CAE através do sêmen.

Os principais sintomas da CAE são a artrite, mastite, pneumonia e encefalite. Esta última é a

forma clínica menos comum e afeta mais frequentemente cabritos entre 60 e 120 dias de idade, que também desenvolvem ataxia e paresia secundárias (PUGH, 2002). Pinheiro et al. (2010a), que fizeram o primeiro relato da forma nervosa da CAE no Brasil, observaram os seguintes sintomas associados à infecção pelo vírus da CAE: aumento da frequência respiratória, fraqueza muscular, tremores, andar em círculo, cegueira em estágio inicial, nistagmo, *head tilt* e ataxia ou paresia dos membros posteriores, evoluindo para a posição supina e/ou lateral.

O controle e a erradicação da CAE são muito difíceis, principalmente devido à ausência de vacinas e à falha na detecção precoce dos animais soropositivos no rebanho. Além disso, a CAE está

¹Méd. Vet., D.Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral Groaíras, km 4, Caixa Postal 145, CEP 62010-970 – Sobral, CE
Email: sider@cnpc.embrapa.br

²Méd. Vet., M.Sc., doutoranda da Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal, SP

³Bolsista, Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE

⁴Bolsista CNPq

⁵M.Sc., Bolsista CNPq

⁶Méd. Vet. M.Sc., Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE

bastante disseminada em rebanhos de alto valor zootécnico. O diagnóstico é feito por meio da análise do histórico e avaliação clínica, incluindo os achados patológicos. A avaliação clínica, no entanto, não é suficiente para determinar a presença da doença, já que os principais sinais clínicos não são patognômicos. Dessa forma, o diagnóstico final deve ser fornecido por meio de técnicas de diagnóstico sorológicas ou moleculares, ou, preferencialmente, através da utilização de ambas (PINHEIRO et al., 2010b). Como métodos sorológicos, podem ser citados a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), o *western blotting* (WB) e o ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). Os métodos moleculares mais utilizados são aqueles baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Até o momento, as técnicas sorológicas são bastante difundidas, graças à sua maior praticidade. No entanto, devido ao fato de serem métodos diagnósticos indiretos, eles apenas detectam os anticorpos contra o vírus após a soroconversão. Assim, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas que identifiquem a partícula viral ou seus ácidos nucleicos, precocemente. Além disso, as técnicas moleculares permitem a avaliação da presença do vírus em amostras diversas, incluindo sangue, leite, líquido sinovial, sêmen, líquido e amostras do trato reprodutivo feminino.

Este comunicado descreve os procedimentos de coleta, processamento do líquido céfalo-raquidiano, para a extração de RNA genômico viral, e de detecção do vírus através da técnica de RT-nested PCR, potencial método de diagnóstico molecular da CAE.

Materiais Necessários

Reagentes

- Água MilliQ
- β -mercapto etanol (β -ME, Sigma)
- Brometo de etídio (Sigma)
- Dietil pirocarbonato (DEPC)
- dNTP mix (Sigma)
- Etanol PA (Merck)
- Improm II™ Reverse Transcription System (Promega)
- NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel)
- Oligonucleotídeos iniciadores customizados (IDT)
- RNase Away (Sigma)
- Tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 5X
- Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio (vortex)
- Agitador magnético

- Agulhas espinhais
- Autoclave
- Balarinas magnéticas
- Balança analítica
- Balão volumétrico de 1000 mL
- Béquer de 1000 mL
- Forno de esterilização
- Frasco de vidro de 1000 mL autoclavável
- Microcentrífuga refrigerada
- Microtubos de 0,5 - 1,5 mL estéreis
- pHmetro
- Pipetas automáticas (10 μ L – 1000 μ L)
- Tubos plásticos de 15 mL (Falcon)

Preparo de soluções

Água tratada com DEPC (0,5%)

Em um balão volumétrico de 1000 mL autoclavado e fornado a 180°C por 4 horas, adicionar 500 μ L de DEPC e completar o volume para 1000 mL com água bidestilada e deionizada (MilliQ). Transferir o líquido para um béquer de 1000 mL autoclavado e fornado, mergulhar uma balarina magnética e tampar com filme plástico; em seguida, fazer pequenos furos no filme plástico com o auxílio de uma tesoura. Deixar em agitação *overnight* em agitador magnético, dentro de uma capela de exaustão de gases. No dia seguinte, passar o líquido para um frasco de 1000 mL previamente autoclavado e fornado, e autoclavar novamente por 15 minutos. Estocar a 4°C.

Tampão Tris-Borato EDTA (TBE) 5X

Em um béquer de 1000 mL, acrescentar 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico e 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0). Dissolver em cerca de 800 mL de água MilliQ, passar a solução para um balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume para 1000 mL. Transferir a solução para um frasco de 1000 mL e estocar a 4°C.

Procedimentos

Coleta de líquido céfalo-raquidiano (LCR)

Antes da coleta, foi feita a tricotomia e antissepsia local com álcool iodado. O LCR foi coletado em tubos Falcon de 15 mL no espaço atlanto occipital – sisterna magna, o qual foi alcançado inserindo uma agulha espinhal no centro do triângulo formado pela protuberância occipital e asas do atlas, de acordo com a metodologia de Coles (1986). As amostras foram mantidas no gelo até o momento do processamento.

Protocolo de Processamento de LCR para Extração de RNA genômico viral:

Cerca de 1 mL de LCR foi transferido a um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 30 minutos, a fim de sedimentar as partículas virais e células eventuais.

Logo depois, a maior parte do sobrenadante foi descartada, deixando no microtubo cerca de 40 mL de solução total (pélete + sobrenadante).

Finalmente, o pélete foi ressuspensionado em 350 mL de tampão RA1 (fornecido no kit NucleoSpin® RNA II - Marcherey-Nagel) e 3,5 µL de β-mercapto etanol (βME). Em seguida, o procedimento prosseguiu o protocolo sugerido pelo manual do fabricante.

É importante ressaltar que o tempo transcorrido entre as coletas e o processamento das amostras não ultrapassou algumas horas e que no período entre os dois procedimentos, as amostras foram mantidas refrigeradas.

Síntese de cDNA (transcrição reversa, RT)

O DNA complementar (cDNA) foi, em seguida, sintetizado com o kit Improm II™ Reverse Transcription System segundo as instruções do fabricante.

Reação de nested PCR

Na amplificação do cDNA, todos os oligonucleotídeos iniciadores foram determinados a partir da região do gene estrutural gag da amostra padrão CAEV-Cork (SALTARELLI et al., 1990). O cDNA é amplificado inicialmente com um par de iniciadores externos (primers 1 - 5'-CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG-3' e 2 - 5'TCCTACCCCATTAATTTGATCCAC-3', descritos por Barlough et al., 1994), resultando na amplificação de um fragmento de DNA de 296pb. O produto desta amplificação é então re-amplificado com iniciadores internos (primers 3 - 5'-GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG-3' e 4 - 5'-ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC - 3', descritos por Andrioli (2001) resultando em um fragmento de 187pb.

As condições de amplificação são realizadas segundo metodologia descrita por Barlough et al. (1994), com algumas modificações (ANDRIOLI et al., 2006).

Eletroforese

Os produtos de amplificação das amostras e os controles positivos e negativos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE e corados com brometo de etídio, conforme Andrioli et al. (2006), visualizados sob luz ultravioleta em

transiluminador e fotografados em fotodocumentador.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Macroprograma 3 da Embrapa (03.07.09.039.00), pelo financiamento deste trabalho.

Referências

ANDRIOLI, A. **Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões**. 2001. 68 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDRIOLI, A.; SOUZA, K. C. de; PINHEIRO, R. R.; SOUSA, F. M. L. **Protocolos para extração do DNA-proviral e PCR do lentivirus caprinos em sangue**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2006b. 5p. (Embrapa Caprinos. Comunicado Técnico, 72).

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D.; VAN HOOSEAR, K.; 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 Virology Methods**, v. 50, p. 101-114, 1994.

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINDOTTIR, S.; WATT, N. J.; DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G.D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 101, p. 199-208, 2004.

COLES, E. H. **Patologia clínica veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Saunders, 1993. 566 p.

CORK, L. C.; HADLON, W. J.; CRAWFORD, T. B. Infectious Leukoencephalomyelitis of young goats. **The Journal of Infectious Disease**, v. 129, p. 134-141, 1974.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, v. 10, p. 251-262, 1993.

PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L.; OLIVEIRA, E. L.; RODRIGUES, A. S.; DIAS, R. P.; SANTIAGO, L. B.; SOUZA, K. C.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H. Nervous form of caprine arthritis-encephalitis: clinical and laboratory parameters. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 10., 2010, Recife.

Technological development and associative attempts to a sustainable small livestock production: annals. Little Rock: IGA, 2010a. 1 CD-ROM.

PINHEIRO, R. R.; BRITO, R. L. L.; VERAS, A. K. A.; RODRIGUES, A. S.; SOUZA, K. C.; OLIVEIRA, E. L.; NASCIMENTO, C. B.; ANDRIOLI, A.; SIDER, L. H. Comparison of serological and molecular methods for caprine arthritis encephalitis diagnosis in goat kids with neurological symptoms. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 10., 2010, Recife.

Technological development and associative attempts to a sustainable small livestock production: annals. Little Rock: IGA, 2010b. 1 CD-ROM.

PUGH, D. C. **Sheep & goat medicine.** Philadelphia: Saunders, 2002. 468 p.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E., Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology**, v. 179, p. 347–364, 1990.

SOUZA, K. C. **Artrite encefalite caprina: Infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico.** 100 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.

Comunicado Técnico, 114 On line

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Caprinos e Ovinos
Endereço: Estrada Sobral/Groaíras, Km 04 - Caixa Postal 145 - CEP: 62010-970 - Sobral-CE
Fone: (0xx88) 3112-7400
Fax: (0xx88) 3112-7455
Home page: www.cnpc.embrapa.br
SAC: <http://www.cnpc.embrapa.br/sac.htm>

1ª edição
On line (Dezembro/2010)

Comitê de publicações

Presidente: Marco Aurélio Deolmondes Bomfim
Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho
Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Tânia Maria Chaves Campelo, Luciana Cristine Vasques Villela, Antônio César Rocha Cavalcante, Sérgio Cobel da Silva, Adriana Brandão Nascimento Machado, Manoel Everardo Pereira Mendes e Geny Rodrigues Cunha de Queiroz (suplente)

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho.
Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos.
Normalização bibliográfica: Tânia Maria Chaves Campelo.
Editoração eletrônica: Fábio Fernandes