

On line

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

Lucia Helena Sider¹
Ana Kamila Andrade Veras²
Alexsandro Nunes de Oliveira³
Roberta Lomonte Lemos de Brito⁴
Alice Andrioli¹
Ana Paula Ravazzolo⁵
Raymundo Rizaldo Pinheiro¹
Ricardo Bastos Sousa⁶

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) pertence ao gênero *Lentivirus*. Acomete caprinos em todo o mundo, causando artrite, encefalite, mamite e pneumonia, diminuindo os índices produtivos e reprodutivos, acarretando, assim, perdas econômicas (ZINK, 1992). A transmissão se dá principalmente pela ingestão de colostro e leite infectados (EAST et al., 1993; MSELLI-LAKHAL et al., 1999), mas também através de contato respiratório (EAST et al., 1993). Além disso, recentemente foi comprovada a transmissão por via sexual, através da inseminação artificial (SOUZA, 2010).

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) replicam, predominantemente, em macrófagos, ao contrário dos vírus humanos, símio e felino, que se replicam tanto em macrófagos como em linfócitos. Este tropismo diferenciado implica em diferentes

manifestações clínicas da doença (CLEMENTS; ZINK, 1996). Os tecidos acometidos, como, por exemplo, as articulações, podem conter uma carga viral potencialmente detectável por meio de testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase e suas variantes. Da mesma forma, o vírus pode ser detectado no sangue, na sua forma livre ou integrada.

Medidas epidemiológicas de controle e o exame periódico por imunodifusão em gel de ágar não são suficientes para o controle e erradicação da doença. Métodos de diagnóstico alternativos se fazem necessários. A reação em cadeia da polimerase precedida pela transcrição reversa (RT-PCR) é uma técnica que se mostra adequada por sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, ela permite a detecção do vírus em sua forma livre (RNA

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

²Bolsista, Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú

³Mestrando, Zootecnia, Universidade Federal do Ceará

⁴Doutoranda, Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal

⁵Méd. Vet., D.Sc., Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁶Méd. Vet., D. Sc.

genômico), antes mesmo da soroconversão. A sua variação RT-nested PCR tem uma sensibilidade ainda maior e é apropriada para a detecção do vírus em amostras clínicas, em que a carga viral é mais baixa.

O RNA é uma molécula instável e sujeita à degradação por Rnases. Uma vez convertido em uma molécula de cDNA, processo conhecido como transcrição reversa, está pronto para ser amplificado pela PCR. Como a carga viral é geralmente baixa, apenas uma rodada de amplificação é insuficiente para que as bandas sejam visualizadas à eletroforese em géis de agarose. Assim, uma segunda rodada de amplificação, com iniciadores internos é feita, caracterizando a técnica de RT-nested PCR. O sucesso dos métodos baseados na amplificação de RNA depende da boa padronização do processamento e extração de RNA das amostras.

Este comunicado descreve os procedimentos de coleta e processamento de líquido sinovial e sangue, seguido pela extração de RNA genômico e, finalmente, o diagnóstico molecular do vírus pela técnica de RT-nested PCR.

Materiais Necessários

Reagentes

- Água MilliQ
- Álcool iodado
- β-mercapto etanol (β-ME, Sigma)
- Brometo de etídio (Sigma)
- Dietil pirocarbonato (DEPC)
- dNTP mix (Sigma)
- Etanol PA (Merck)
- Improm IITM Reverse Transcription System (Promega)
- NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel)
- Oligonucleotídeos iniciadores costumizados (IDT)
- RNase Away (Sigma)
- Solução de Lise de Eritrócitos (SLE) estéril
- Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

Equipamentos e vidrarias

- Agitador de tubos de ensaio (vortex)
- Agitador magnético
- Agulhas e seringas (5 mL) para coleta de líquido sinovial
- Autoclave
- Bailarinas 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 µL – 1000 µL)
- Tubos plásticos de 15 mL (Falcon)
- Tubos vacutainer com EDTA de 4 mL, adaptador e agulhas

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 mL 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 bailarina 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 .

Solução de lise de eritrócitos (SLE) estéril (NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,0)

Em um béquer de 100 mL autoclavado e fornado, acrescentar 1,2 g de Tris. Dissolver com cerca de 50 mL de água-DEPC e acertar o pH para 7,0. Passar a solução para um balão volumétrico de 100 mL autoclavado e fornado, e completar o volume para 100 mL de solução.

Em um béquer de 1000 mL, acrescentar 0,585 g de NaCl e 0,475 g de MgCl₂. Acrescentar 100 mL da solução de Tris 100 mM previamente preparado e água-DEPC suficiente apenas para dissolver. Transferir a solução para um balão volumétrico de 1000 mL autoclavado e fornado e completar o volume até o menisco. Transferir a solução para um frasco de 1000 mL autoclavado, e autoclavar novamente. Estocar a 4°C.

Coleta de sangue e líquido sinovial

Imediatamente antes das coletas, foi feita a antissepsia do local com álcool iodado. O sangue foi coletado por venipuntura da jugular em tubos vacutainer de 4 mL contendo EDTA. As amostras de líquido sinovial foram coletadas, bilateralmente, com agulha e seringa. As amostras de sangue e líquido sinovial foram mantidas em gelo até o momento do processamento.

Protocolo de processamento do sangue

A quantidade de 1 mL de sangue coletado foi transferida a um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL estéril. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 g, a 4°C por 5 minutos.

O sobrenadante (aproximadamente 30% do volume) foi cuidadosamente removido com uma pipeta, evitando-se tocar no pélete (60-70% do volume).

Ao pélete, adicionou-se 1 mL de solução de lise de eritrócitos (MgCl₂ 5mM, NaCl 10mM e Tris-HCl 10mM, pH 7,0) e ressuspendeu-se o pélete, pipetando cuidadosamente por 4 a 5 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 400 g a 4°C por 5 minutos.

As lavagens foram repetidas três vezes, até que o pélete se mostrasse claro. Os péletes foram então ressuspendidos em 350 µL de tampão RA1 (primeiro tampão constituinte do kit NucleoSpin® RNA II - Marcherey-Nagel) e 3,5 µL de β-mercapto etanol (βME). Este tampão constitui o primeiro passo do processo de extração descrito pelo manual do fabricante do kit baseado em coluna (NucleoSpin® RNA II -Marcherey-Nagel) que foi feito logo em seguida.

Protocolo de processamento de líquido sinovial

As amostras de líquido sinovial foram transferidas (1 mL) para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL estéreis e foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 30 minutos, para sedimentação de células e vírus livres.

Os péletes foram então ressuspendidos em 350 µL de tampão RA1 e 3,5 µL de βME e imediatamente feita a extração de RNA, conforme as instruções do manual do fabricante

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'TCCTACCCCATAATTTGATCCAC-3', descritos por Barlough et al., 1994), resultando na

amplificação de um fragmento de DNA de 296pb. O produto desta amplificação é então reamplificado 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 viral em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões.** 2001. 68 f. Tese (Doutorado) - 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, 2006. 5 p. (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.

CLEMENTS, J. E.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 100-117, 1996.

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.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J. GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLONDE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection in vitro. **Virology**, v. 259, n. 1, p. 67-73, Jun., 1999.

SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A. M.; VIGNE, R.; CLEMENTS, J. E. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. **Virology**, v. 179, n. 1, p. 347-364, Nov., 1990.

SOUZA, K. C. de. **Artrite-encefalite caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico**. 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia. Área de concentração: Reprodução de ruminantes) - Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral.

ZINK, M. C. The pathogenesis of lentiviral disease in sheep and goats. **Seminars in Virology**, v. 3, p. 147-155, 1992.

Comunicado Técnico, 115 On line

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

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



1ª edição
On line (Outubro/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