



Avaliação do RT-nested PCR como método de diagnóstico da artrite-encefalite caprina em cabritos com sintomatologia nervosa

Ana Kamila Andrade Veras(1) - Roberta Lomonte Lemos de Brito(2) - Apoliana de Sousa Rodrigues(3) - Kelma Costa de Souza(4) - Eduardo Luís Oliveira(5) - Alice Andrioli(6) - Lucia Helena Sider(7) - Raymundo Rizaldo Pinheiro (8) -

1. Universidade Estadual Vale do Acaraú/Bolsista Embrapa - 2. Embrapa Caprinos e Ovinos/CNPq - 3. Embrapa Caprinos e Ovinos/CNPq - 4. Embrapa Caprinos e Ovinos/CNPq - 5. Embrapa Caprinos e Ovinos - 6. Embrapa Caprinos e Ovinos - 7. Embrapa Caprinos e Ovinos - 8. Embrapa Caprino e Ovinos -

PALAVRAS-CHAVE

CAE, vírus, forma nervosa, líquido, RT-nested PCR, cabritos

APOIO

Embrapa

INTRODUÇÃO

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença viral crônica, multissistêmica e de natureza debilitante. O controle e erradicação são difíceis devido à ausência de vacinas eficazes e à detecção geralmente tardia de animais positivos. Dentre os sintomas, a forma nervosa é rara e geralmente afeta cabritos com idades entre 60-120 dias (PUGH, 2002). A avaliação clínica não é suficiente para determinar a doença, uma vez que as principais manifestações podem ser confundidas com outras doenças. O diagnóstico final deve ser realizado por técnicas sorológicas e moleculares. Os métodos sorológicos já estão bastante difundidos devido a sua maior conveniência. No entanto, devido à sua natureza indireta, eles só detectam anticorpos após a soroconversão, tornando necessário o uso de técnicas moleculares capazes de identificar ácidos nucleicos virais de maneira mais precoce. Além disso, os métodos moleculares permitem analisar vários tipos de amostras, não ficando limitados à amostra sorológica.

OBJETIVOS

Avaliar a técnica de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa com duas rodadas sucessivas de amplificação (RT-nested PCR) para a detecção de RNA genômico livre em amostras de sangue e líquido céfalo-raquidiano provenientes de sete cabritos com sintomatologia nervosa e sorologicamente positivos para a artrite-encefalite caprina de acordo com o teste western blot.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em novembro de 2008 na Embrapa Caprinos e Ovinos. De uma população de 71 cabritos, com idades entre 87 e 103 dias, 7 apresentaram sintomas neurológicos compatíveis com a CAE. Após a conclusão da avaliação clínica, os cabritos foram submetidas à coleta de sangue por punção da veia jugular utilizando tubos vacutainer, com EDTA. Os leucócitos foram isolados e o RNA extraído com o sistema NucleoSpin-RNA II (Macherey Nagel). O RNA foi então convertido a cDNA com o ImProm-ITM Reverse Transcription System (Promega). O cDNA passou por duas rodadas de amplificação do gene estrutural gag com primers externos (BARLOUGH; EAST; ROWE et al., 1994) e internos (ANDRIOLI, 2001). O líquido céfalo-raquidiano (LCR) foi coletado de acordo com PUGH (2002). Alíquotas foram centrifugadas a 12.000g a 4°C por 30 minutos para sedimentar as partículas virais livres. Os péletes resultantes foram submetidas a processos de extração de RNA, seguidos de RT-nested PCR, como descrito acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De uma população de 71 cabritos, sete apresentaram sintomas neurológicos e aumento de frequência cardíaca, sendo cinco machos (Ma1-5) e duas fêmeas (Fe1-2). O diagnóstico precoce é indispensável para a prevenção e controle eficazes da infecção pelo vírus da CAE e não deve ser baseado somente em sinais clínicos, uma vez que eles não são específicos para esta doença. A detecção de anticorpos e/ou partículas virais são indicados para o diagnóstico precoce (Reina et al, 2009). Todos os sete animais foram sorologicamente positivos de acordo com o teste western blot. Com exceção do animal Fe1, todos os animais foram também positivos no sangue para o RNA viral da CAE. Por outro lado, os animais Ma1-3 e Fe1-2 foram positivos no líquido céfalo-raquidiano e os animais Ma4-5, negativos. Dessa forma, sempre, em pelo menos uma das amostras (sangue e/ou líquido), os animais foram positivos pelo RT-nested PCR, demonstrando a aplicabilidade deste teste molecular no caso de animais sintomáticos.

CONCLUSÕES

A RT-nested PCR, uma técnica molecular, permite fazer o diagnóstico da CAE a partir de amostras distintas (sangue, líquido céfalo-raquidiano e outras). Além disso, mostrou-se importante na confirmação de testes sorológicos em animais sintomáticos que já soroconverteram e que ainda possuem carga viral razoável. A técnica molecular também abre a perspectiva de diagnóstico precoce de animais ainda assintomáticos que tiveram contato com animais positivos para a doença.

REFERÊNCIAS

- ANDRIOLI, A. Vírus da artrite encefalite caprina: PCR e isolamento em amostras de sêmen, fluido uterino e embriões. Belo Horizonte, MG: UFMG - Escola de Veterinária, 2001. 68p. Tese (Doutorado).
- 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.
- PUGH, D. C. *Sheep & Goat Medicine*. Philadelphia: Saunders, 2002. 468 p.
- REINA, R. ; BERRIATUA, E.; LUJÁN, L.; JUSTE, R. SÁNCHEZ, A.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: An update. *The Veterinary Journal*, v. 182, p. 31-37, 2009.