

INFECÇÃO DE CORDEIROS POR LENTIVÍRUS CAPRINO

Infection of lambs by caprine lentivirus

ABSTRACT

In order to evaluate the transmission of lentivirus of goats to sheep, this study was conducted using three experimental groups. The first (G1) was formed by lambs that received colostrum from goats positive for small ruminant lentiviruses (SRLV) in the first 24 hours of life. The second (G2) was the control group, consisting of lambs that suckled colostrum and milk from negative mothers. Third group (G3) was established from lambs receiving milk from positive goats for SRLV. The animals were monitored by nested PCR, using leukocytes extracted from peripheral blood. Positive results were observed in lambs of G1 and G3. Therefore, considering the detection of proviral DNA in lambs, the potential of cross-transmission should be considered, especially for the development of health programs for small ruminants.

Keywords: colostrum, milk, sheep, SRLV, cross-transmission.

Palavras-chave: colostro, leite, LVPR, ovinos, transmissão cruzada.

INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) são retrovírus causadores da artrite-encefalite caprina (CAE) e maedi-visna (MV), esta em ovinos. Durante anos, esses vírus foram considerados como específicos a cada espécie (1). Entretanto, análises filogenéticas e constatações de infecção cruzada demonstraram que existem diferentes genótipos e subtipos lentivirais, capazes de infectar tanto o caprino quanto o ovino (2, 3, 4, 5). Logo, este trabalho teve como finalidade avaliar a possibilidade de infecção de cordeiros por cepa de lentivírus circulante em rebanho caprino.

MATERIAL E MÉTODOS

Os cordeiros que constituíram os grupos experimentais foram filhos de matrizes e reprodutores de rebanho ovino livre de LVPR, monitorado por *immunoblotting*. O primeiro grupo (G1) foi estabelecido por nove cordeiros submetidos à mamada artificial de *pool* de colostro de cabras positivas para LVPR, durante as primeiras 24 horas de vida. O segundo grupo (G2) foi o controle, constituído por dez cordeiros, que mamaram colostro e leite naturalmente das suas mães negativas. O terceiro grupo (G3) foi formado por nove cordeiros submetidos à mamada artificial de *pool* de leite de cabras positivas para LVPR, durante 15

dias, a partir da segunda semana de vida. Amostras de sangue foram obtidas antes da primeira mamada e com 24h, sete, 15, 30, 50, 70, 90, 120 e 150 dias do início do experimento. Para o G3, não houve a coleta de 24h.

As amostras de sangue foram tratadas com cloreto de amônio para obtenção dos leucócitos (6). Em seguida, realizou-se a extração de DNA através da metodologia de Grimberg et al. (7). A técnica de PCR *Nested* foi executada seguindo-se o método de Barlough et al. (8) modificado por Andrioli et al. (9). Nas duas etapas de amplificação, utilizaram-se diferentes pares de iniciadores determinados a partir da região *gag* da cepa padrão CAEV-Cork (10). Os iniciadores externos foram aplicados para amplificação de um fragmento-alvo de 297pb (8) e os iniciadores internos, para a obtenção de um fragmento-alvo final de 185pb (11). As amostras testadas, o controle positivo e negativo, além do marcador de pares de bases (100pb), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, para visualização em transiluminador de luz ultravioleta.

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Vale do Acaraú (CEUA/UVA), sob o número 001.12.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais do grupo controle (G2), constituído por cordeiros que mamaram colostro e leite naturalmente de suas mães negativas para LVPR, apresentaram resultados negativos no teste de PCR *Nested*, do nascimento aos 150 dias de vida. Por outro lado, resultados positivos foram observados nos outros dois grupos, após a mamada do *pool* de colostro (G1) e de leite (G3) de cabras positivas para LVPR, a partir da constatação de amplificação do DNA proviral. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos para os grupos G1 e G3 ($p>0,05$), entretanto, houve diferença significativa entre estes e o G2 ($p<0,05$), pelo teste qui-quadrado.

Em relação ao G1, todos os animais obtiveram pelo menos dois resultados positivos durante o experimento. Sete dos nove animais foram positivos já no sétimo dia de vida e os outros dois animais restantes tiveram o primeiro resultado positivo no 15º dia. Durante o período avaliado, observou-se intermitência dos resultados. Ou seja, houve alternância entre o estado de positividade e negatividade para o mesmo animal, em momentos diferentes. Dos nove animais, 11,11% (1/9) apresentaram cinco resultados positivos; 11,11% (1/9), quatro resultados positivos; 33,33% (3/9), três resultados positivos e 44,44% (4/9), dois resultados positivos, durante os 150 dias de observação.

Para o G3, todos os nove animais obtiveram pelo menos um resultado positivo durante o experimento, havendo também alternância entre positividade e negatividade nos resultados de alguns animais. Resultados positivos foram observados após sete, 30, 90, 120 e 150 dias da primeira ingestão do *pool* de leite de cabras positivas para LVPR. Dos nove animais, 11,11% (1/9) apresentaram três resultados positivos; 55,56% (5/9), dois resultados positivos e 33,33% (3/9), um resultado positivo, durante os 150 dias de observação.

Estes resultados estão de acordo com a patogenia dos LVPR, que infectam principalmente células da linhagem monocítico-fagocitária, aderindo-se a elas pela ligação da glicoproteína do seu envelope a receptores específicos na membrana celular. Após a penetração, a transcriptase reversa gera DNA de dupla fita (provírus) a partir do RNA viral, que se integra ao DNA cromossômico da célula hospedeira (12).

Demonstrou-se, dessa forma, a ocorrência da infecção de cordeiros por lentivírus oriundo de caprinos. Estudos têm demonstrado que a transmissão cruzada de LVPR está relacionada à ausência de medidas sistemáticas de controle (5) e à criação consorciada entre caprinos e ovinos (1, 3, 4), destacando-se o fornecimento de leite ou colostro contaminado de uma espécie para a outra (13), conforme resultados obtidos neste experimento.

Manifestações clínicas não foram observadas durante o período experimental. Entretanto, sabe-se do caráter progressivo, degenerativo, multissistêmico e crônico das lentivirose e que nem todos os animais infectados apresentam sinais da doença (13). Logo, um maior período de observação é necessário para avaliar a importância da infecção cruzada do ponto de vista clínico.

CONCLUSÕES

A partir da constatação de DNA proviral de LVPR em cordeiros submetidos à mamada artificial de colostro e leite de cabras positivas, conclui-se que o potencial da transmissão cruzada do vírus entre caprinos e ovinos deve ser considerado para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle das lentivirose de pequenos ruminantes.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pelo fomento ao projeto e concessão de bolsa de doutorado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S. Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol.* 2007; 88: 3423-3427.
2. Castro RS, Greenland T, Leite RC, Gouveia A, Mornex JF, Cordier G. Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of Brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis–encephalitis virus and visna–maedi virus. *J Gen Virol.* 1999; 80: 1583-1589.
3. Shah CA, Böni J, Huder JB, Vogt HR, Mühlher J, Zanoni R, Miserez R, Lutz H, Schüpbach J. Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade. *Virology.* 2004; 319: 12-26.
4. Pisoni G, Quasso A, Moroni P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentiviruses subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology.* 2005; 339: 147-152.
5. Giammarioli M, Bazzucchi M, Puggioni G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes.* 2011; 43: 380-384.
6. Angelopoulou K, Karanikolaou K, Papanastasiopoulou M. First partial characterisation of small ruminant lentiviruses from Greece. *Vet Microbiol.* 2005; 109: 1-9.
7. Grimberg J, Nowoschik S, Belluscio L, Mckee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17 (20): 83-90.
8. Barlough J, East N, Rowe JD, Hoosear KV, 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. *J Virol Methods.* 2004; 50: 101-113.
9. Andrioli A, Gouveia AMG, Martins AS, Pinheiro RR, Santos DO. Fatores de risco na transmissão do lentivírus caprino pelo sêmen. *Pesq Agropec Bras.* 2006; 41 (8): 1313-1319.
10. Saltarelli M, Querat G, Konings DAM, Vigne R, Clements JE. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology.* 1990; 179: 347-364.
11. Rimstad E, East NE, Torten M, Higgins J, Derock E, Pedersen NC. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. *Am J Vet Res.* 1993; 54: 1858-1862.
12. Gendelman HE, Narayan O, Kennedy-Stoskopf S, Kennedy PGE, Ghotbi Z, Clements JE, Stanley J, Pezeshkpour G. Tropism of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J Virol.* 1986; 58 (1): 67-74.
13. Peterhans E, Greenland T, Badiola J, Harkiss G, Bertoni G, Amorena B, Eliazewicz M, Juste R, Kraßnig R, Lafont J, Lenihan P, Pétursson G, Pritchard G, Thorley J, Vitu C, Mornex J, Pépin M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. *Vet Res.* 2004; 35: 257-274.