

# Estabelecimento de parâmetros experimentais para detecção de lentivírus de pequenos ruminantes (SRLVs) por heminested PCR

Isabella Victória Casco Flores <sup>1</sup>, Ana Paula Ravazzolo <sup>2</sup> (Orient.)

<sup>1</sup>Bolsista PROBIC-FAPERGS; <sup>2</sup>Prof. Associado, Faculdade de Veterinária - UFRGS

\*Contato: isacasco@hotmail.com



UFRGS  
PROPESQ

XXVISIC  
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

## INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes ou SRLVs (*small ruminant lentivirus*) compreendem o vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e o vírus Maedi-Visna dos ovinos (MVV), os quais pertencem à família *Retroviridae*, sendo biológica, fenotípica e antigenicamente relacionados. Esses vírus integram seu material genético ao do hospedeiro, causando uma infecção persistente com longo período de incubação, produzindo doenças crônicas de evolução lenta. O desenvolvimento dos sinais clínicos resulta em prejuízos econômicos, fator que somado à inexistência de uma vacina, tornam extremamente importante o diagnóstico de animais infectados, diminuindo a disseminação do vírus no rebanho. Estudos recentes demonstraram que a utilização de *primers* mais degenerados para o diagnóstico por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) possibilitou a detecção de um maior número de amostras positivas (Dolfini e Ravazzolo, 2013). Contudo, 16 amostras detectadas pelos *primers* menos degenerados nesses estudos não foram detectadas por aqueles com maior grau de degeneração, demonstrando a necessidade de alterações da técnica para a otimização do teste. Paralelamente, foram avaliadas 22 amostras de sangue de ovino congeladas provenientes de uma fazenda com suspeita de MVV no Acre com o intuito de avaliar a eficácia do novo protocolo de testes estabelecido.

## OBJETIVO

O objetivo desse projeto foi aperfeiçoar o diagnóstico de SRLV por PCR, amplificando regiões do genoma comuns ao MVV e ao CAEV por meio do método de *heminested* PCR e definindo os protocolos para utilização dos *primers* degenerados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 159 amostras (132 caprinas e 27 ovinas) coletadas na década de 90 e congeladas à -20 °C. Para comprovar sua integridade foi realizado PCR para GAPDH. O gene *gag* foi escolhido por apresentar sequências conservadas em diferentes amostras de SRLVs. Dois pares de *primers* foram utilizados: L3/LRT3 e L4/LRT3, L3.1/LRT3 e L4.1/LRT3. Do total das amostras analisadas, as 16 que apresentaram discrepâncias diagnósticas foram selecionadas para o presente estudo.

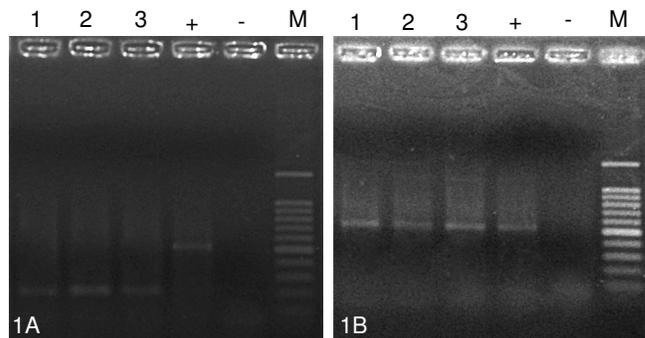
A partir dos resultados obtidos no trabalho anterior realizaram-se novos experimentos alterando as concentrações dos *primers* mais degenerados (de 2 até 6 ng/μL) e a temperatura de anelamento da reação (de 50 até 57 °C).

Foi utilizado o método de extração DNAzol após o descongelamento em temperatura ambiente e centrifugação das 22 amostras de sangue de ovino congeladas. Essas foram posteriormente analisadas utilizando-se o novo protocolo.

## RESULTADOS

Das 14 amostras caprinas e 2 ovinas que haviam apresentado resultado positivo para L3/L4 e negativo para L3.1/L4.1, todas apresentaram resultado positivo quando submetidas a maiores concentrações de L3.1/L4.1. As 22 amostras de sangue avaliadas foram positivas com este protocolo.

Com relação à temperatura de anelamento, as alterações realizadas não demonstraram resultados relevantes para essas amostras. Em contrapartida, ao analisar as 22 amostras de sangue verificou-se o aparecimento de bandas inespecíficas com temperatura de anelamento de 55 °C (Figura 1A), fator não observado elevando-se essa temperatura para 57 °C (Figura 1B).



**Figura 1A-** Eletroforese de três amostras de sangue ovino congeladas (1, 2, 3), controle positivo (+), controle negativo (-) e marcador (M), utilizando-se uma temperatura de anelamento de 55 °C.  
**Figura 1B-** Eletroforese da mesma sequência de amostras utilizando-se uma temperatura de anelamento de 57 °C.

## DISCUSSÃO

Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou 1,5 μL (6 ng/μL) dos *primers* L3.1/L4.1 e 1 μL (4 ng/μL) do *primer* LRT3 (diferindo das concentrações anteriores: 0,5 μL ou 2 ng/μL de todos os *primers*) em um volume final de reação de 25 μL, uma vez que todas as amostras positivas para L3/LRT3 e L4/LRT3 e negativas para L3.1/LRT3 e L4.1/LRT3, passaram a apresentar resultados positivos. Assim, o aumento da concentração dos *primers* aumentou a sensibilidade da reação.

Ao analisar as 22 amostras de sangue foi possível verificar que a elevação da temperatura de 55 para 57 °C aumentou a especificidade da reação.

## REFERÊNCIAS

DOLFINI, T.F.; RAVAZZOLO, A.P. Estudo comparativo de pares de *primers* para detecção de lentivírus de pequenos ruminantes (SRLVs) por *heminested* PCR. In: Salão de Iniciação Científica UFRGS, 25., 2013, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pró-reitoria de Pesquisa, 2013. <http://hdl.handle.net/10183/91111>