

Implantação de teste diagnóstico para a artrite encefalite caprina baseado em PCR em tempo real (qPCR)*

Bianca Schneck Simão^{1**}, Ana Paula Ravazzolo²

¹ Graduanda em Medicina Veterinária, UFRGS

² Professora Orientadora – Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS

INTRODUÇÃO

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) é membro da família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, transmitido principalmente através do colostro e leite de fêmeas infectadas, durante as primeiras mamadas dos recém-nascidos. As manifestações clínicas aparecem após um longo período de incubação do vírus, sendo as mais comuns a artrite em animais adultos e encefalite em animais jovens, podendo haver também casos de mamite e pneumonia. O diagnóstico precoce é um fator essencial no controle da doença.

Os métodos moleculares, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), são indicados para identificação de animais positivos para a doença. A implantação de PCR exige o conhecimento das sequências de nucleotídeos das variantes virais circulantes. A fim de que sejam identificadas regiões mais conservadas, que possam ser utilizadas como alvo para o desenho de *primers* e sondas da PCR em tempo real (qPCR), será realizado o sequenciamento de amostras virais de diversas propriedades oriundas de diferentes estados brasileiros.

OBJETIVOS

- Geral: utilização do método de PCR em tempo real (qPCR) para identificar animais infectados com o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV).
- Específico: realizar o sequenciamento de amostras virais circulantes e o alinhamento das sequências para identificação de regiões conservadas, a fim de delinear novos *primers* e otimizar a detecção de amostras circulantes locais do lentivírus caprino.

METODOLOGIA

1. *Seminested* PCR com *primers* degenerados para amplificação do gene *gag* (Dolfini *et al.*, 2015).
2. Clonagem dos fragmentos, em plasmídeo, e purificação a partir de bactérias *E. coli*.
3. Sequenciamento e análise das sequências obtidas.

RESULTADOS

1. PCR: foram obtidos 41 fragmentos de 57 amostras oriundas de quatro propriedades do RS (Figura 1).

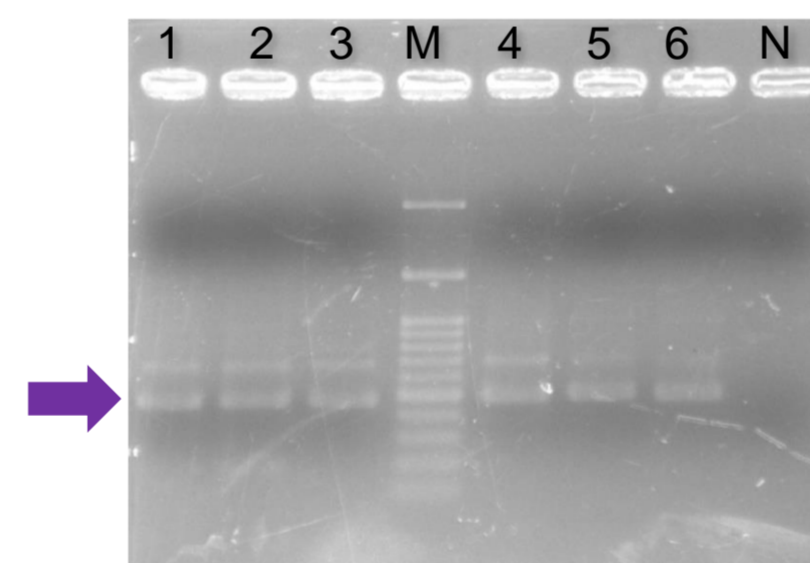


Figura 1 – Eletroforese de seis amostras de caprinos da mesma propriedade (1, 2, 3, 4, 5, 6), controle negativo (N) e marcador (M). Nesse caso, todas as amostras são positivas quanto à presença do fragmento indicado pela seta.

2. Clonagem: inicialmente realizamos a clonagem de uma amostra a fim de confirmar a identidade dos fragmentos.

3. Sequenciamento: confirmou-se a identidade da sequência obtida (Figura 2). A seguir, realizaremos a clonagem e sequenciamento das demais amostras.

Score	Expect	Identifies	Gaps	Strand
671 bits(363)	0.0	437/474(92%)	0/474(0%)	Plus/Plus
Query 96	TTGGCCATGATCCCTGSAATAGAGCTCAAAAAGGTTAATTCAGGGAAATTAATAG	155		
Sbjct 1109	TTGGCCATGATCCCTGSAATAGAGCTCAAAAAGGTTAATTCAGGGAAATTAATAG	1168		
Query 156	GAGCCAGAAAGTGGAGGAAATATCCACCCTCCAGCAGGAGGAGGATTAACAGT	215		
Sbjct 1169	GAGCCAGAAAGTGGAGGAAATATCCACCCTCCAGCAGGAGGAGGATTAACAGT	1228		
Query 216	GATCAATATGGGGTAGGACAAACAAATCAGCCAGCAGCAGTACATGATGATG	275		
Sbjct 1229	GATCAATATGGGGTAGGACAAACAAATCAGCCAGCAGCAGTACATGATGATG	1288		
Query 276	SCAAGCCAAATCTCCCTGCAATGGTCTATCAGGATTAAGATCAGTAAACATATG	335		
Sbjct 1289	SCAAGCCAAATCTCCCTGCAATGGTCTATCAGGATTAAGATCAGTAAACATATG	1348		
Query 336	CATAGCCAGGAAATCCATGCTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	395		
Sbjct 1349	CATAGCCAGGAAATCCATGCTAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	1408		
Query 396	SCAGCAGACTCTTAGAGCAATAGATCAGAGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	455		
Sbjct 1409	SCAGCAGACTCTTAGAGCAATAGATCAGAGCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	1468		
Query 456	TAAAGCTAACATATCTTATACAAATGCAAGTCCAGATTCAGAAACAAATGATG	515		
Sbjct 1469	TAAAGCTAACATATCTTATACAAATGCAAGTCCAGATTCAGAAACAAATGATG	1528		
Query 516	GTACTAGGACAGAGATCAGCAGGATGATGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	569		
Sbjct 1529	GTACTAGGACAGAGATCAGCAGGATGATGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	1582		

Figura 2 – Alinhamento da sequência obtida (Query) com o protótipo CAEV-Cork.

* Projeto realizado em colaboração com a Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, CE

** Bolsista IC voluntária no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular – UFRGS

REFERÊNCIAS

DOLFINI *et al.*, 2015. Comparison of primer pairs: Greater degeneracy improves small ruminant lentivirus (SRLVs) detection by seminested PCR. *Small Ruminant Research* 123, 189-192.