

T 636 .089 69

C 192 B

2001

Marcelo Fernandes Camargos

**PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR PARA O DIAGNÓSTICO DA LEUCOSE  
ENZOÓTICA BOVINA E SEQÜENCIAMENTO PARCIAL DO GENE *ENV***

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite.

Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2001

C172p  
2001

Camargos, Marcelo Fernandes, 1975-

Padronização de uma PCR para o diagnóstico da leucose enzoótica bovina e seqüenciamento parcial do gene env / Marcelo Fernandes Camargos. – Belo Horizonte: UFMG-Escola de Veterinária, 2001.

38p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Leucose Bovina – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Título.

CDD – 636.208 969

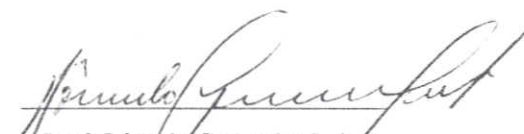
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

27/11/01

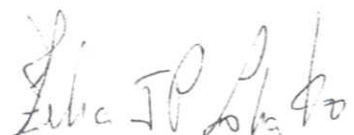
1594101-09


0322-17860

Dissertação defendida e aprovada em 1º de outubro de 2001, pela comissão examinadora constituída por:

  
Prof. Rômulo Cerqueira Leite  
Orientador



  
Profa. Zélia Inês Portela Lobato

  
Prof. Maurílio Andrade Rocha

  
Profa. Isabella Bias Fortes Ferraz

  
Dr. Daniel Stancek

À Deus pelas oportunidades e força. Aos meus pais, José Fernandes Camargos e Aparecida Melo Camargos, pelo apoio e exemplos, à Ana Paula Gonçalo pela paciência e carinho, aos meus irmãos Jonas Henrique de Melo Camargos e André Luiz de Melo Camargos, pela compreensão e a todos os familiares e amigos que estiveram do meu lado.  
Dedico este trabalho.

*"Deus quer, o homem sonha, a obra nasce."*  
Fernando Pessoa

*"DE TUDO, FICARAM TRÊS COISAS:  
a certeza de que estamos sempre começando...  
a certeza de que é preciso continuar...  
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...  
PORTANTO DEVEMOS fazer da interrupção um caminho novo...  
da queda um passo de dança...  
do medo, uma escada...  
do sonho, uma ponte...  
da procura...  
um encontro"*  
Fernando Sabino

*"O único homem que nunca comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma. Não tenha medo de errar, pois você aprenderá a não cometer duas vezes o mesmo erro."*  
Roosevelt

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de vivenciar esta experiência.

Ao grande amigo e orientador Prof. Rômulo Cerqueira Leite pelas oportunidades, ensinamentos e incentivos.

Especialmente, ao Prof. Maurílio Andrade Rocha, pelas sugestões e auxílios no momento em que tive que redirecionar a elaboração desta dissertação.

Ao Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pela orientação inicial no desenvolvimento dessa dissertação.

Ao Prof. Henrique César Pereira Figueiredo pelos auxílios e sugestões.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Rômulo Cerqueira Leite, Prof. Maurílio Andrade Rocha, Profa. Zélia Inês Portela Lobato, Profa. Isabela Bias Fortes e Dr. Daniel Stancek pelas contribuições dadas a este trabalho e que foram úteis para o engrandecimento deste.

Ao Prof. Lúcio Carlos Gonçalves pelos conselhos e apoio.

A Profa. Edel Figueiredo Barbosa pelos ensinamentos e apoio.

Aos colegas de mestrado pelos auxílios e pelos bons momentos de convívio.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, que colaboraram de forma direta ou indireta para a execução deste trabalho. Especialmente ao Leandro Moreira Lessa, pelo auxílio técnico e à Nádia pela paciência e ajuda na formatação da dissertação.

Ao Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação da Escola de Veterinária pela atenção e colaboração.

À FAPEMIG, CNPq, CAPES e FEP/MVZ pelo auxílio financeiro.

---

**SUMÁRIO**

---

|           |   |    |
|-----------|---|----|
|           | <b>RESUMO</b> .....   | 13 |
|           | <b>ABSTRACT</b> .....   | 13 |
| <b>1.</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 15 |
| <b>2.</b> | <b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....  | 15 |
| 2.1       | HISTÓRICO .....   | 15 |
| 2.2       | O VÍRUS .....   | 16 |
| 2.3       | A INFECÇÃO.....   | 16 |
| 2.4       | DIAGNÓSTICO DA LEB .....  | 17 |
| 2.4.1     | MÉTODOS SOROLÓGICOS .....   | 17 |
| 2.4.2     | PCR.....  | 17 |
| <b>3</b>  | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 19 |
| 3.1       | AMOSTRAS EXPERIMENTAIS .....  | 19 |
| 3.2       | DETECÇÃO DE ANTICORPOS .....  | 19 |
| 3.3       | PCR.....  | 19 |
| 3.3.1     | EXTRAÇÃO DO DNA .....   | 19 |
| 3.3.2     | INICIADORES .....   | 19 |
| 3.3.3     | DNA CONTROLE.....   | 19 |
| 3.3.4     | AMPLIFICAÇÃO.....   | 20 |
| 3.4       | ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR .....   | 20 |
| 3.4.1     | ELETROFORESE .....  | 20 |
| 3.4.2     | AValiação DA SENSIBILIDADE DA PCR .....   | 20 |
| 3.4.3     | AValiação DA ESPECIFICIDADE DA PCR .....  | 20 |
| 3.5       | ANÁLISE ESTATÍSTICA .....   | 21 |
| <b>4</b>  | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....   | 21 |
| 4.1       | DETECÇÃO DO DNA PROVIRAL EM AMOSTRAS DE SANGUÍNEAS DE BOVINOS.....                        | 21 |
| 4.2       | DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR .....  | 23 |
| 4.3       | DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA PCR .....   | 24 |
| 4.4       | COMPARAÇÃO ENTRE PCR E IDGA NA IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEB..... | 29 |
| <b>5</b>  | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 31 |
| <b>6</b>  | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | 31 |

---

**LISTA DE TABELAS**

---

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Iniciadores, seqüência de bases e localização no gene codificador para a proteína gp 51 do vírus da LEB ..... | 19 |
| Tabela 2 | Comparação entre PCR e IDGA na detecção do vírus da LEB .....   | 29 |
| Tabela 3 | Resultados da IDGA e PCR segundo a faixa etária dos animais examinados .....                                  | 31 |

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Representação esquemática do genoma do vírus da LEB .....                             | 18 |
| Figura 2 | Representação esquemática do vírus da LEB.....  | 18 |
| Figura 3 | Seqüência parcial de nucleotídeos do gene codificador para a glicoproteína gp51 ..... | 21 |
| Figura 4 | Resultados da PCR em amostras de DNA de leucócitos de bovinos .....                   | 22 |

|                        |   |    |
|------------------------|---|----|
| Figura 5               | Resultados da PCR em amostras de DNA de leucócitos de bovinos .....   | 22 |
| Figura 6               | Canaleta, número de identificação e faixa etária de algumas das amostras utilizadas na PCR.....   | 23 |
| Figura 7               | Determinação da sensibilidade da PCR .....  | 24 |
| Figura 8               | Determinação da especificidade da PCR .....   | 25 |
| Figura 9               | Resultado do BlastN das amostras sequenciadas .....   | 26 |
| Figura 10              | Resultado do BlastP das amostras sequenciadas.....  | 27 |
| Figura 11              | Alinhamento de três seqüências amplificadas pela PCR, com uma seqüência japonesa do vírus da LEB depositada no GenBank. As letras em vermelho representam nucleotídeos substituídos, levando em consideração a seqüência K02120. .... | 28 |
| Figura 12              | Alinhamento de três seqüências preditas de aminoácidos, com uma seqüência de japonesa. As letras em vermelho representam aminoácidos substituídos, levando em consideração a seqüência K02120 .....                                   | 29 |
| <b>LISTA DE ANEXOS</b> |   |    |
| Anexo 1                | Seqüências dos fragmentos amplificados pela PCR e depositados no GenBank .....  | 36 |



## RESUMO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença de origem viral responsabilizada pelo desenvolvimento de linfossarcomas em bovinos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando os iniciadores BLV1 e BLV2, foi utilizada com sucesso para amplificação e detecção de parte do gene do envelope (*env*) em amostras de leucócitos de bovinos soropositivos e soronegativos para o vírus da LEB. A sensibilidade da PCR foi determinada pela diluição seriada de uma amostra de DNA e realização de PCR, obtendo-se o valor de 120 pg de DNA, como a quantidade mínima para a obtenção de resultados positivos na PCR. A especificidade da PCR foi confirmada por restrição enzimática com Bam HI e pelo sequenciamento de três amostras. Os resultados obtidos com a PCR foram comparados com os da Imunodifusão em gel de agar (IDGA), observando-se uma concordância de 73,8% entre os testes.

**Palavras-chave:** Leucose Enzoótica Bovina (LEB); Reação da cadeia da polimerase (PCR); Imunodifusão em gel de agar (IDGA); Diagnóstico; Sequenciamento; Gene *env*.

## ABSTRACT

The Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is viral disease responsible for the development of lymphosarcomas in cattle. The polymerase chain reaction (PCR) using the primers BLV1 and BLV2, was used with success for amplification and detection of a part of the envelope gene (*env*) in samples of bovine leucocytes from EBL-seropositive and EBL-seronegative animals. The sensitivity of PCR was determined by the accomplishment of PCR in tubes containing serial dilutions of DNA extracted from a sample isolated from an infected animal. The load of 120pg of DNA as template for PCR gave positive results. The specificity of PCR was determined by enzymatic restriction with Bam HI and by sequence analysis of three samples. The results obtained with PCR and agar gel-immunodiffusion (AGID) were compared, with 73,8% agreement between the tests.

**Keywords:** Enzootic Bovine Leukosis (EBL); Polymerase chain reaction (PCR); Agar gel-immunodiffusion (AGID);Diagnosis; Sequencing; Gene *env*.

## 1 INTRODUÇÃO

O processo de globalização está provocando uma quebra nas barreiras comerciais entre os países do mundo. Os países considerados desenvolvidos, muitas vezes bloqueiam a entrada de produtos vindos de países em desenvolvimento, pela criação de barreiras sanitárias, pois possuem rebanhos em melhores condições sanitárias. O Brasil deve aproveitar-se das condições favoráveis que possui para produção de bovinos, e deste mercado que está se abrindo e que quer comprar, principalmente, carne de qualidade e saudável. Para isso são necessárias a avaliação da situação das enfermidades presentes nos rebanhos, a certificação da acurácia dos testes de diagnóstico e o estudo de estratégias para o controle e/ou erradicação de doenças.

A importância econômica da LEB é desconhecida. Entretanto existem relatos mostrando que a LEB estava envolvida com a morte de animais por linfossarcoma, rejeições de carcaça ao abate, queda no desempenho produtivo e reprodutivo de animais soropositivos e com linfocitose persistente, e com restrições à importação e exportação de bovinos soropositivos.

O controle da doença é difícil devido à sua grande disseminação, principalmente, nos rebanhos leiteiros, por evoluir lentamente, com isso apresentando grande número de animais assintomáticos, devido à inexistência de um programa de controle oficial e por não ser reconhecida pela maioria dos produtores rurais e técnicos como uma doença que cause prejuízos significativos.

O controle da LEB é baseado na identificação dos animais infectados e separação e/ou abate destes. Existem vários métodos de detecção laboratorial da infecção pelo vírus da LEB. Os métodos diretos são baseados na detecção do vírus, de seu genoma e/ou DNA proviral, e os mais comumente utilizados são o isolamento, microscopia eletrônica, ensaios de indução de sincícios e a PCR e suas variantes. Os métodos indiretos são baseados na resposta de anticorpos, sendo os mais utilizados a imunodifusão em gel agar (IDGA), devido à sua simplicidade e os

ensaios imunoenzimáticos (ELISAs), devido à sua sensibilidade. Entretanto, nem sempre é possível detectar a infecção utilizando métodos sorológicos.

Embora seja indiscutível a importância da IDGA, empregada rotineiramente no diagnóstico sorológico da LEB, pode ser necessária uma técnica de diagnóstico capaz de confirmar casos duvidosos. A PCR e suas variações vem sendo utilizada no diagnóstico de infecções pelo vírus da LEB, associada aos métodos sorológicos.

Em um programa de controle/erradicação de doenças infecciosas, inicialmente utiliza-se um teste de triagem para detecção dos animais infectados, com o andamento do programa, com a separação e/ou eliminação dos animais infectados, é necessário a utilização de um teste de diagnóstico mais sensível e específico, daí a importância da utilização de provas de diagnóstico tais como a PCR.

Os objetivos deste trabalho foram a padronização de uma PCR para o diagnóstico da LEB e verificar a eficiência do sistema de PCR desenvolvido, frente a IDGA.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2-1 HISTÓRICO

Apesar de alguns relatos sobre leucose em bovinos na literatura médica alemã no século XIX (Leisering, 1871, citado por Johnson e Kaneene, 1992), a doença e o agente viral só foram descritos no final da década de 60 nos Estados Unidos (Miller, 1969). A difusão do vírus ocorreu devido a introdução de animais europeus infectados em países livres da doença. A LEB está amplamente distribuída pelo mundo, não estando presente somente em alguns países europeus (Reino Unido, República Checa, Dinamarca, Finlândia e Noruega), entretanto, em outros países já foram iniciados programas de controle e erradicação da doença, como por exemplo na Bélgica, Holanda, Austrália e Argentina (Office International des Epizooties, 2001). No Brasil, Rangel e Machado (1943), ao realizarem um levantamento sobre a frequência de neoplasias nos animais domésticos, no estado de Minas Gerais, assinalaram pela primeira vez, a

ocorrência de linfossarcomas em bovinos. Todavia, relato publicado por Merck et al. (1959), no Rio Grande do Sul, parece assinalar oficialmente o primeiro diagnóstico clínico da doença em rebanhos criados no Brasil. Atualmente a doença está presente em praticamente todos os estados brasileiros, sendo encontrada com maior frequência nos rebanhos leiteiros (Modena et al., 1984; Castro et al., 1992; Moraes et al., 1996; D'Angelino et al., 1998; Molnar et al., 1999; Camargos et al., 2000).

## 2-2 O VÍRUS

O vírus da LEB é membro da família Retroviridae, gênero *BLV/HTLV* (The International Committee on Taxonomy of Viruses, 2001). O vírus infecta e transforma preferencialmente linfócitos B, mas é encontrado também em células T, monócitos e granulócitos (Schwartz et al., 1994). Possui a capacidade de estabelecer infecção persistente em uma subpopulação de linfócitos B pela integração do DNA viral ao genoma da célula do hospedeiro. O genoma do vírus (Figura 1) é formado por 8714 bases (Sagata et al., 1985) e é constituído por duas fitas de RNA simples idênticas, sentido positivo, ligadas não covalentemente, que funcionam como molde para a síntese de DNA viral, via ação da transcriptase reversa. Nas extremidades 3' e 5' existem duas seqüências repetidas idênticas com mesma orientação (*ltr* - terminação longa repetitiva). Entre as *ltr* estão distribuídos os genes para proteínas estruturais *gag* e *env* e para enzimas virais (*pol* - transcriptase reversa, protease, integrase e dUTPase), além de pequenas regiões que codificam proteínas reguladoras Tax, Rex (Burny et al., 1988). O genoma viral possui aproximadamente 50% de homologia aos vírus linfotrópicos T humanos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2).

O vírus da LEB apresenta formato esférico, com diâmetro de 80 a 130 nm (Figura 2). É composto por três camadas, a mais interna é o complexo genoma-nucleoproteína, que inclui aproximadamente 30 moléculas da enzima transcriptase reversa. O complexo genoma-nucleoproteína é englobado por um capsídeo icosaédrico que contém em seu interior, também, moléculas de RNA transportador (RNA<sub>T</sub>), que

iniciam a síntese de DNA. O capsídeo é envolvido pelo envelope fosfolipídico externo, derivado da membrana celular do hospedeiro, que contém glicoproteínas de superfície e transmembrana associadas covalentemente (Fields e Knipe, 1990).

O gene *env* codifica uma poliproteína precursora das glicoproteínas gp51 (externa do envelope) e gp30 (transmembrana). A proteína gp51 está envolvida com a adsorção, com a indução da formação de sincícios e anticorpos neutralizantes, sendo a proteína imunodominante e a que mais precocemente é detectada por anticorpos. O gene codificador para a proteína gp51 apresenta uma região variável, onde estão localizadas as seqüências codificadoras dos epítomos envolvidos com importantes funções biológicas na relação vírus-hospedeiro (F, G e H), e uma região conservada, onde estão as seqüências codificadoras dos demais epítomos A, B, C, D e E (Mamoun et al., 1990).

## 2-3 A INFECCÃO

A transmissão da LEB resulta principalmente da transferência de linfócitos infectados para animais susceptíveis. A utilização de agulhas, instrumental cirúrgico, marcação de animais, luvas para palpação retal, premunicação contra babesiose e anaplasmose, a ação mecânica de tabanídeos e a alimentação com leite ou colostro provenientes de vacas infectadas são as principais causas de infecção. A doença caracteriza-se por uma infecção persistente que se prolonga durante toda a vida do animal, o que é devido à presença do provírus nas células do hospedeiro. Uma célula infectada contém de uma a quatro cópias do provírus (Kettmann et al., 1980). A doença pode apresentar quadro clínico que varia de infecção inaparente, com aproximadamente 30% dos animais apresentando linfocitose persistente ou apresentar-se como uma forma tumoral, encontrada em aproximadamente 0,5 a 5,0% dos bovinos com mais de quatro anos de idade e que rapidamente leva à morte. Os tumores ocorrem com maior frequência no útero, linfonodos mesentéricos, linfonodos retrobulbares, coração, abomaso e no canal medular, estando portanto, a sintomatologia relacionada ao local de aparecimento dos linfossarcomas (Toma et al., 1990).

## 2-4 DIAGNÓSTICO DA LEB

### 2-4-1 MÉTODOS SOROLÓGICOS

A infecção pelo vírus, normalmente, é demonstrada pela presença de anticorpos na IDGA e nas diversas variações do ELISA, principalmente para a glicoproteína externa gp51 e para a proteína do capsídeo p24. Na maioria dos casos, os títulos de anticorpos para gp51 são mais altos. Trinta a 40 dias após a infecção já é possível a detecção de anticorpos. Dentre os métodos sorológicos a IDGA apresenta menor sensibilidade que o ELISA (Miller et al., 1981; Simard et al., 2000).

Em algumas situações, as provas sorológicas falham na identificação dos animais infectados, como por exemplo, quando ocorrem mudanças nos títulos de anticorpos, como por exemplo no periparto (Gentile et al., 1985; Ebertus et al., 1987), em bezerros alimentados com colostro de vacas soropositivas (Ballagi-Pordany et al., 1992) e em animais infectados recentemente, visto que a detecção de anticorpos ocorre no mínimo três semanas após a infecção. Além disso, a ocorrência de bovinos infectados, permanentemente soronegativos, ou com baixos títulos de anticorpos periodicamente ou constantemente, tem sido demonstrada (Kaaen et al., 1982; Burkhardt et al., 1993; Eaves et al., 1994). Foi relatado que animais persistentemente infectados pelo vírus da Diarréia Bovina a Vírus (VDBV) apresentam resposta imune deprimida à infecções pelo vírus da LEB (Roberts et al., 1988, 1989).

### 2-4-2 PCR

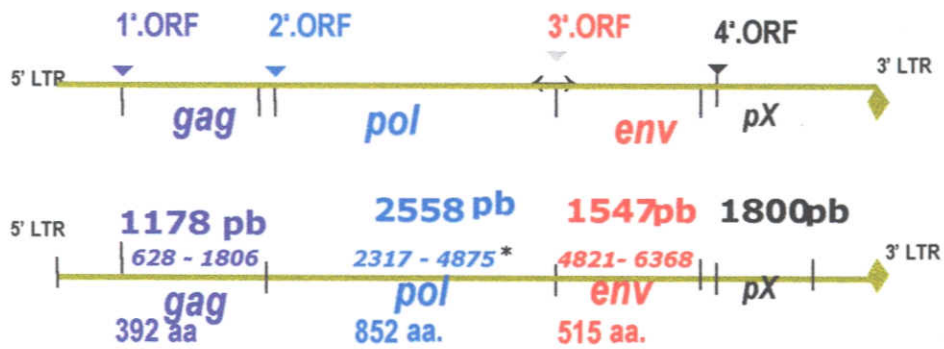
A PCR tem permitido a detecção de fragmentos genômicos de muitos agentes infecciosos em amostras clínicas, sendo um método sensível para o diagnóstico de doenças infecciosas (Deacon e Lah, 1989).

A PCR é uma técnica usada para amplificação *in vitro* de fragmentos de genomas selecionados, resultando na amplificação dessas seqüências em poucas horas (Belak e Ballagi-Pordani, 1993). A técnica é baseada na repetição cíclica e automática de três simples reações: desnaturação térmica da fita dupla do DNA; anelamento de iniciadores nas fitas desnaturadas e síntese da fita

complementar na seqüência molde de DNA. Este fenômeno ocorre através da extensão de cada iniciador anelado, pela ação de enzimas. Teoricamente, após 25 ciclos, a fita inicial de DNA terá sido amplificada na ordem de  $10^6$  vezes (Deacon e Lah, 1989).

A PCR é uma técnica especialmente recomendável, uma vez que os métodos de diagnósticos tradicionais requerem longos e complexos procedimentos, como cultivo de células para obtenção de antígenos, por exemplo. Outra vantagem da PCR, comparada a outros métodos que utilizam DNA, é a concentração a ser detectada. A técnica de hibridização, por exemplo, é capaz de detectar apenas a quantidade de ácidos nucleicos que estejam presentes no material a ser examinado. Por sua vez, a PCR pode detectar pequenas quantidades identificáveis (Belak e Ballagi-Pordani, 1993).

A PCR já vem sendo utilizada para detecção de bovinos e ovinos infectados pelo vírus da LEB (Naif et al., 1990; Brandon et al., 1991). Já foram utilizados iniciadores para diferentes regiões do genoma do vírus, *gag*, *env* e *pol* (Murtaugh et al., 1991), *pol* e *px* (Sherman et al., 1992), *gag* e *env* (Agresti et al., 1993), *ltr* e *env* (Blankenstein et al., 1998), *gag* (Marsolais et al., 1994), *pol* (Dube et al., 1997), *env* (Brandon et al., 1991; Ballagi-Pordány et al., 1992; Klintevall et al., 1994; Fechner et al., 1996; Gonzalez et al., 1999), *ltr* (Kuzmak et al., 1993). Os resultados obtidos por estes autores foram variáveis em relação à sensibilidade e à concordância com os testes sorológicos, dependendo da variante da PCR utilizada.



\* Posições dos nucleotídeos

Figura 1 – Representação esquemática do genoma do vírus da LEB (Adaptado de Burny et al., 1988).

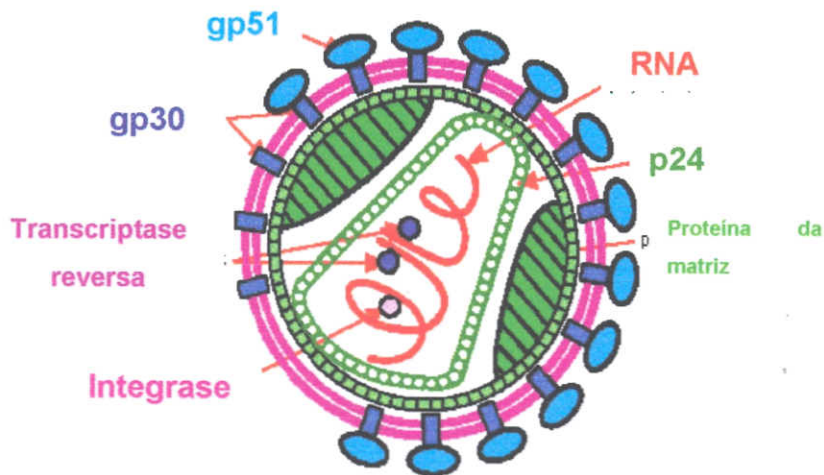


Figura 2 - Representação esquemática do vírus da LEB (Adaptado de Burny et al., 1988).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3-1 AMOSTRAS EXPERIMENTAIS

Para comparação de duas técnicas de diagnóstico é necessário a coleta de pelo menos 30 amostras soropositivas e 30 amostras soronegativas, desta forma foram coletadas amostras até que se atingisse esse número mínimo (Sampaio, 1998). As amostras foram coletadas de 65 animais da

raça Holandesa Preto e Branco (HPB), provenientes de uma fazenda localizada na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais. Os animais pertenciam a três faixas etárias: I, com animais de sete a 18 meses de idade, II, de 19 a 30 e III, com mais de 31 meses de idade. Durante a formação desse rebanho foram importados animais dos Estados Unidos da América. Já haviam sido registrados casos de LEB nesse rebanho, mas no momento da coleta nenhum animal demonstrava sintomatologia clínica.

#### 3-2 DETECÇÃO DE ANTICORPOS

A detecção de anticorpos para o vírus da LEB foi realizada pela técnica de IDGA, utilizando antígenos gp51 e p24 produzidos comercialmente

(EMBRAPA/CNPISA), segundo Miller e Van der Maaten (1977).

#### 3-3 PCR

##### 3-3-1 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA foi obtido diretamente de sangue total utilizando o GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Obtendo-se aproximadamente 120 µg de DNA a partir de 300 µl de sangue.

##### 3-3-2 INICIADORES

A construção dos iniciadores baseou-se na seqüência do gene codificador da glicoproteína gp51 do vírus da LEB, buscando a amplificação de fragmentos de 521 pares de bases (pb). Escolheu-se iniciadores do gene *env*, por essa região ter importantes funções na replicação viral e na resposta imune do hospedeiro. O fragmento escolhido faz parte de uma região conservada do gene *env*, segundo relatos da literatura (Rice et al., 1984; Mamoun et al., 1990). Os iniciadores BLV1 e BLV2 (Tabela 1) sintetizados pela Gibco-BRL, foram selecionados utilizando-se os programas de computador Oligo Primer Analysis (National Biosciences, Inc.) e Oligotech (Version 1.0, 1995).

Tabela 1 – Iniciadores, seqüências de bases e localização do gene codificador para a proteína gp51 do vírus da LEB.

| Iniciadores <sup>a</sup> | Seqüências de bases           | Localização <sup>b</sup> |
|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| BLV1 (+)                 | 5'-GGCCATGGTCACATATGATTG-3'   | 5128-5149                |
| BLV2 (-)                 | 5'-CGTTGCCTTGAGAAACATTGAAC-3' | 5627-5649                |

<sup>a</sup> (+) Senso; (-) Anti-senso.

<sup>b</sup> Os números correspondem àqueles da seqüência do vírus da LEB descrita por Sagata et al. (1985).

##### 3-3-3 DNA CONTROLE

O DNA utilizado como controle positivo na PCR, foi obtido a partir de células de rim fetal ovino persistentemente infectadas pelo vírus da LEB, que são células originadas dos Estados Unidos da América (Van der Maaten e Miller, 1976). Utilizou-se células de rim bovino (MDBK) para verificar a ocorrência de anelamento dos iniciadores com seqüências do

genoma bovino, e o conseqüente aparecimento de amplificações inespecíficas.

### 3-3-4 AMPLIFICAÇÃO

As reações foram realizadas em um volume total de 20 µl contendo 10 mM TrisHCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1% de glicerol (p/v), 1% de DMSO (p/v), 10 pmoles de cada iniciador, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo<sup>1</sup>, 0,5 U de Taq DNA polimerase<sup>2</sup> e 1 µl da preparação de DNA, que contém aproximadamente 150 ng de DNA, foi usada para amplificação. Uma fina camada de óleo mineral foi adicionada a cada tubo. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador programável<sup>3</sup>. Os ciclos padronizados para amplificação do DNA foram: uma incubação inicial a 95°C por 3 minutos, o que era seguido por 35 ciclos, cada um consistindo de desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 59°C por 60 segundos, extensão pela polimerase a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

### 3-4 ANÁLISE DOS PRODUTOS DE PCR

#### 3-4-1 ELETROFORESE

Dez microlitros de cada reação de PCR foram submetidos à eletroforese (100V por 1 hora) em géis de agarose 1% (p/v) corridos em tampão TAE 1X (20,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,4 M Tris-acetato, 10 mM EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml). Para determinação do tamanho dos produtos de PCR incluiu-se em cada corrida o marcador de tamanho molecular φX-174 digerido com HaeIII<sup>2</sup> com fragmentos variando de 72 a 1353 pares de base (pb) ou o marcador 100pb DNA Ladder<sup>2</sup> com fragmentos variando de 100 a 2072 pb. Em toda reação havia um tubo controle de reagentes, que não continha DNA, controle positivo e negativo (DNA de células MDBK). Os géis foram visualizados e fotografados sob iluminação U.V. (320nm), utilizando o sistema de fotografia Image Master VDS<sup>4</sup>.

#### 3-4-2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR

<sup>1</sup> Promega, EUA.

<sup>2</sup> Gibco-BRL, EUA.

<sup>3</sup> MJ Research, Inc., EUA.

<sup>4</sup> Amersham Pharmacia Biotech, Suécia.

O DNA obtido a partir de uma amostra de sangue, que foi diluído e dosado em espectrofotômetro (UV-160 A – Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 260nm. Foram feitas diluições decimais do DNA e PCR para verificar até em que diluição obtinha-se amplificação.

#### 3-4-3 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA PCR

A especificidade da PCR foi avaliada por restrição enzimática e pelo sequenciamento dos fragmentos amplificados a partir de três amostras. Os produtos de PCR foram purificados com o kit Wizard PCR Preps DNA Purification System<sup>1</sup>, conforme protocolo do fabricante, e em seguida submetidos a digestão enzimática com Bam HI<sup>1</sup>, conforme recomendação do fabricante. A amostra foi incubada a 37°C por uma hora. Os produtos da restrição deveriam ter aproximadamente, 400 e 100 pb, como está demonstrado na Figura 3. O resultado da restrição foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo.

Produtos de PCR obtidos de amostras de sangue de três amostras, e purificados conforme acima, foram submetidos à reação de sequenciamento feita por ciclagem térmica em um sequenciador automático<sup>5</sup>. A seqüência obtida foi editada e avaliada para a remoção de seqüências dos iniciadores, além da possível resolução de algumas ambigüidades. A seqüência editada foi então analisada para a determinação de similaridades em relação aos ácidos nucléicos e aminoácidos, utilizando-se os programas BlastN e BlastX, na versão "gapped", contra os bancos de dados nr e dbEST. Estes programas se encontram disponíveis no endereço eletrônico do NCBI<sup>6</sup> ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O alinhamento foi efetuado através do programa CLUSTAL W (1.81), que se encontra disponível no endereço eletrônico do European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). As

<sup>5</sup> ALF (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia) do BIOAGRO, Universidade Federal de Viçosa-MG.

<sup>6</sup> National Center for Biotechnological Information

foi efetuado através do programa CLUSTAL W (1.81), que se encontra disponível no endereço eletrônico do European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>). As seqüências foram comparadas com uma seqüência de origem japonesa, depositada no GenBank (Número de acesso K02120).

### 3-5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de concordância entre os resultados obtidos na PCR e IDGA foi utilizado o teste kappa ( $\kappa$ ) (Smith, 1995).

5128 **ggg ccatggtae atagattgc** gagececgat  
 5161 gcccattagt gggggcagat cggflegact geececaetg ggacaatgce tcccaggetg  
 5221 atcaaggatc cffftatgte aatcaatcaga fttfatctet geatctcaaa caatgcatg  
 5281 gaattttcaec tetaacctgg gagatatggg gatatgatec cetgateacc ttttetttae  
 5341 ataagatccc tgateccccf caacecgact ttecccagtt gaacagtgae tgggttccet  
 5401 etgctagatc atgggcccgt cttftaante aaacagcagc ggecttccca gaetgtgeta  
 5461 tatgttggga accttcccet cctgggcte ccgaaatatt agtatataac aaaacctet  
 5521 ccagctctgg acccggeete geectecceg acgcccanaal etctgggte aactgctet  
 5581 cgtftaacac caaccaagga tggcaaccac etteccagag gtgtgtggtc **aatgtttctc**  
 5641 **aaggcaacg**

Figura 3 – Seqüência parcial de nucleotídeos do gene codificador para a glicoproteína gp51. Os iniciadores estão em negrito e a localização do sítio da enzima Bam HI está sublinhado (Sagata et al., 1985).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4-1 DETECÇÃO DO DNA PROVIRAL EM AMOSTRAS SANGUÍNEAS DE BOVINOS

A PCR desenvolvida para amplificação parcial do gene codificador da proteína gp51 mostrou-se eficiente, específica e sensível. Utilizando altas condições de exstringência, obteve-se uma forte banda do tamanho esperado e ausência de bandas inespecíficas. O kit utilizado para extração de DNA mostrou-se eficiente. Alguns dos resultados da PCR estão demonstrados nas Figuras 4 e 5.

As amostras testadas na PCR, as respectivas canaletas e figuras, número de identificação, faixa etária e resultados na PCR estão demonstradas no Quadro 1.



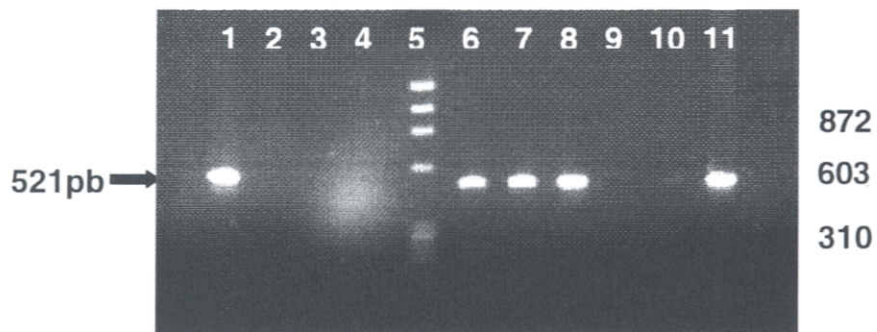


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. A posição da banda de 521pb é demonstrada pela seta. Canaleta 1: controle positivo, canaleta 2: controle negativo, canaleta 3: controle de reagentes, canaleta 5: marcador de tamanho molecular  $\phi$ X174 (o tamanho correspondente às bandas está demonstrado à direita do gel).

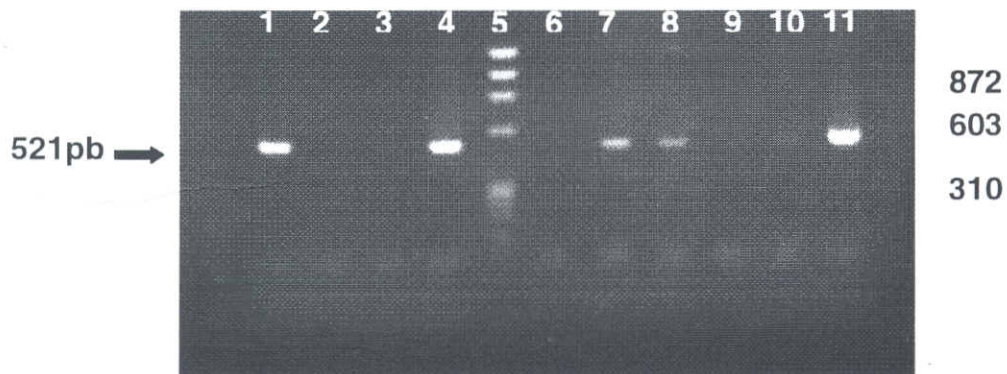


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Canaleta 1: controle positivo, canaleta 5: marcador de tamanho molecular  $\phi$ X174.

Figura 6 – Canaleta, número de identificação e faixa etária de algumas das amostras utilizadas na PCR.

| FIGURA 4 |               |              |                   |
|----------|---------------|--------------|-------------------|
| Canaleta | Identificação | Faixa etária | Resultados na PCR |
| 4        | 912           | II           | NEGATIVO          |
| 6        | 733           | III          | POSITIVO          |
| 7        | 617           | III          | POSITIVO          |
| 8        | 871           | III          | POSITIVO          |
| 9        | 920           | II           | NEGATIVO          |
| 10       | 917           | II           | POSITIVO          |
| 11       | 499           | III          | POSITIVO          |
| FIGURA 5 |               |              |                   |
| 2        | 925           | II           | NEGATIVO          |
| 3        | 899           | II           | NEGATIVO          |
| 4        | 676           | III          | POSITIVO          |
| 6        | 918           | II           | NEGATIVO          |
| 7        | 678           | III          | POSITIVO          |
| 8        | 921           | II           | POSITIVO          |
| 9        | 861           | III          | NEGATIVO          |
| 10       | 856           | III          | POSITIVO          |
| 11       | 1749          | II           | POSITIVO          |

#### 4-2 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE DA PCR

A concentração de DNA de uma amostra foi estimado por espectrofotometria obtendo-se 120 ng/μl. Em seguida foi diluída e submetida a PCR. Até a diluição  $10^{-3}$  obteve-se amplificação visível (Figura 7), o que corresponde a 120 pg de DNA, como a quantidade mínima de DNA necessária para obtenção de resultados positivos na PCR. A PCR desenvolvida foi capaz de detectar o vírus da LEB em diluições de DNA extraído de sangue de bovinos, até o limite de 120 pg de DNA, o que equivale dizer que é necessário a presença de pelo menos 100 células infectadas na amostra clínica, para a obtenção de um resultado positivo na PCR. A reação de PCR padrão foi realizada utilizando-se 120 ng de DNA bovino, que é equivalente a aproximadamente  $10^5$  células. Um microlitro de sangue contém aproximadamente 4.000 linfócitos, destes 0,05 a 0,5% devem estar

infectados, então, teoricamente seriam necessários de 5 a 50 ul de sangue para extração do DNA (Murtaugh et al., 1991; Brandon et al., 1991). No presente trabalho foi utilizado 300 ul de sangue para extração do DNA, o que, portanto, é uma quantidade suficiente de sangue para obtenção de DNA.

Diferentes variantes da PCR foram desenvolvidas por outros autores, utilizando iniciadores para regiões diferentes, com limites de detecção variando de 17 fg a 100 pg. As maiores sensibilidades foram alcançadas utilizando-se PCR associada com hibridização, reamplificação e PCR semi-nested (Naif et al., 1990; Brandon et al., 1991; Murtaugh et al., 1991; Jacobs et al., 1992; Mirsky et al., 1993; Agresti et al., 1993).

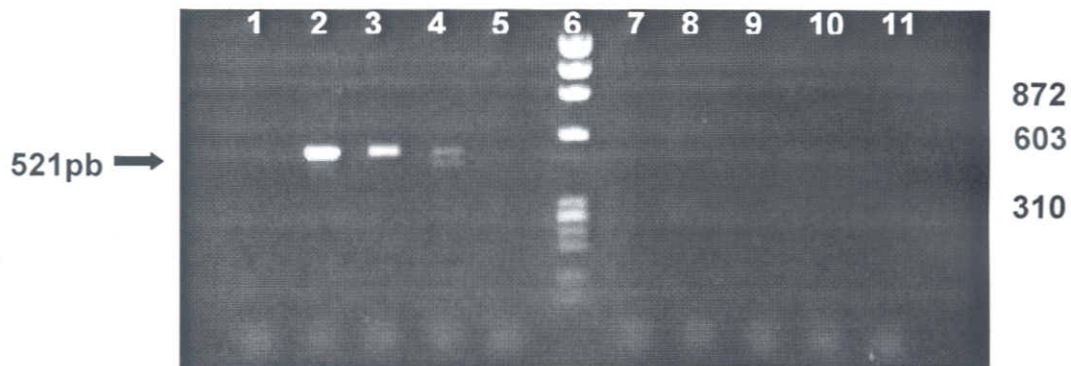


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Determinação do limite de detecção da PCR. Canaleta 1: controle de reagentes, canaleta 2: amostra 304, canaleta 3: amostra 304 diluída  $10^{-2}$ , canaleta 4: amostra 304 diluída  $10^{-3}$ , canaleta 5: amostra 304 diluída  $10^{-4}$ , canaleta 6: marcador de tamanho molecular  $\phi$ X174, canaleta 7: amostra 304 diluída  $10^{-5}$ , canaleta 8: amostra 304 diluída  $10^{-6}$ , canaleta 9: amostra 304 diluída  $10^{-7}$ , canaleta 10: amostra 304 diluída  $10^{-8}$  e canaleta 11: amostra 304 diluída  $10^{-9}$ .

#### 4-3 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA PCR

A especificidade do produto amplificado foi confirmada pela restrição enzimática com Bam HI (Figura 8), com a obtenção de fragmentos esperados, de aproximadamente 400 e 100 pb. Além disso, com a utilização de DNA de células MDBK livres de infecção pelo vírus, não obteve-se amplificação, mostrando que os iniciadores não se anelaram ao genoma dos bovinos (Figura 4).

Além de confirmar a especificidade da PCR, a restrição do gene *env* do vírus da LEB com Bam HI, segundo Rice et al. (1984) e Mamoun et al. (1990), pode classificar o vírus quanto à presença desse sítio, sendo que amostras européias não apresentam o sítio e amostras nipo-americanas apresentam-no. Pelo resultado obtido na restrição enzimática, e pelos resultados obtidos no

seqüenciamento de três amostras brasileiras, estas amostras analisadas podem ser enquadradas no subgrupo nipo-americano. Amostras argentinas (González et al., 1999), e australianas (Coulston et al., 1990) analisadas, também apresentaram o sítio para Bam HI, de restrição. Acredita-se que a amostra européia deu origem às demais, tendo o sítio de restrição para Bam HI surgido através de trocas de nucleotídeos (Mamoun et al., 1990).

Os resultados obtidos com o seqüenciamento de três amostras mostraram que os fragmentos amplificados mostraram grande similaridade à outras seqüências do vírus da LEB depositadas no GenBank, como pode ser observado nas figuras 9 e 10, que demonstram, respectivamente os resultados obtidos utilizando-se os programas BlastN e BlastP.

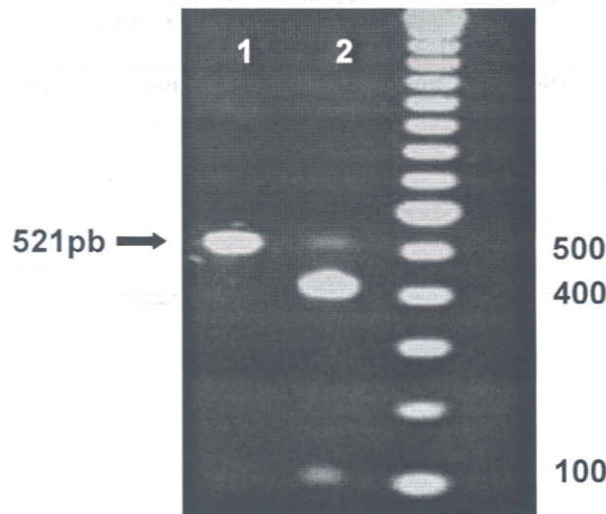
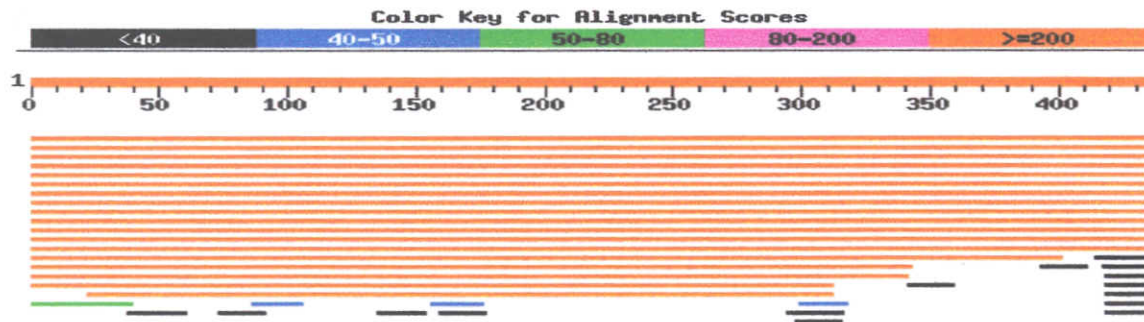


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo. Canaleta 1: produto de PCR purificado, canaleta 2: produtos da digestão com Bam HI, canaleta 3: marcador de tamanho molecular 100pb DNA Ladder/Gibco BRL (o tamanho correspondente às bandas está demonstrado à direita do gel).

As seqüências obtidas foram depositadas no GenBank, e receberam os seguintes números de acesso AF399702, AF399703 e AF399704 (Anexo 1). Essa foi a primeira submissão de seqüências do vírus da LEB brasileiras. Comparando-se a seqüência de uma amostra japonesa (número de acesso K02120), com as seqüências obtidas no presente estudo, encontrou-se de 96 a 98% de homologia de nucleotídeos. Nas amostras AF399702 e AF399703, houve 22 substituições de nucleotídeos, que resultaram na substituição de sete e oito aminoácidos, respectivamente. Na amostra AF399704 foram verificadas nove substituições de nucleotídeos, que levaram à troca de cinco aminoácidos (Figuras 11 e 12).

O alto nível de conservação das seqüências do gene *env*, descrita no presente trabalho, foi relatado em outros trabalhos. Portetelle et al. (1989), compararam a seqüência do gene *env* de uma amostra belga do vírus da LEB, com uma seqüência americana, uma australiana e uma japonesa, encontrando de 11 a 13 mudanças de aminoácidos. Mamoun et al. (1990), seqüenciaram todo gene *env* de cinco amostras do vírus da LEB (Dos Estados Unidos da América, da França e Bélgica), e as compararam

uma seqüência japonesa e um belga já publicadas. Encontraram 3,5% de variabilidade entre as amostras nipo-americanas e européias. Dentro de cada subgrupo foram encontrados de 0,5 a 1,6% de variação genética. Coulston et al. (1990), seqüenciaram todo o genoma de uma amostra do vírus da LEB, de origem australiana, encontrando na região *env* 3% de variabilidade, quando compararam a seqüência com uma seqüência japonesa e uma belga, e de 0,71% a 0,78% de variabilidade nos aminoácidos codificados pelo gene *env*. Molteni et al. (1996), seqüenciaram parcialmente o gene *env* de duas amostras italianas do vírus da LEB, e compararam com seqüências dos Estados Unidos da América, do Japão, da Bélgica e da Austrália, encontrando entre 2,7 e 3,6% de diferenças entre as diferentes seqüências, já as seqüências de aminoácidos variaram entre 1,8 e 3,6%. Fechner et al. (1997), seqüenciaram cinco amostras da Alemanha do vírus da LEB, e as compararam com outras nove seqüências descritas, encontrando até 5,3% de variação entre as seqüências do gene *env*. Dube et al. (2000), seqüenciaram uma amostra argentina e encontraram 95,1%, 95,6%, 95,9% de homologia de nucleotídeos, com respectivamente, seqüências da Austrália, Bélgica e Japão.



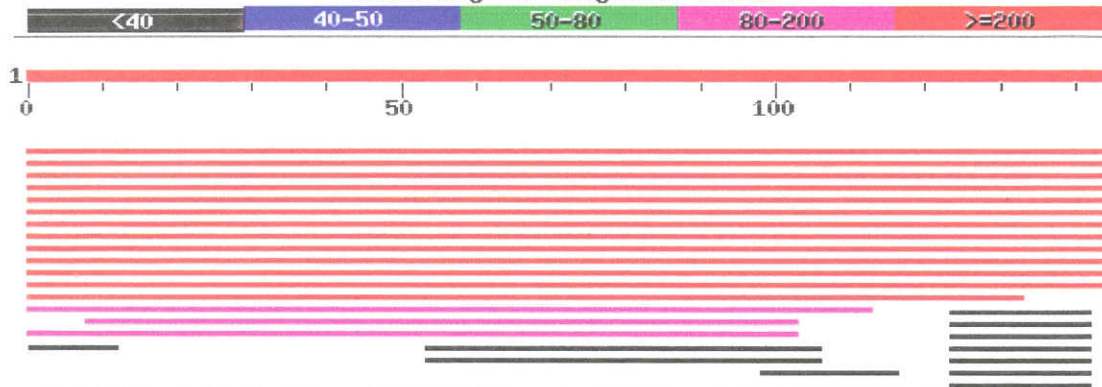
Sequences producing significant alignments:

| Sequence ID   | Description                         | Score      | E Value |
|---|-------------------------------------|------------|---------|
| <a href="#">gi 9626225 ref NC_001414.1 </a>           | Bovine leukemia virus, complete...  | <u>731</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 2801494 gb AF033818.1 AF033818</a>     | Bovine leukemia virus com...        | <u>731</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 210774 gb M35238.1 BLVENVA</a>         | Bovine leukemia virus (isolat...    | <u>731</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 210771 gb K02251.1 BLVENV</a>          | Bovine leukemia virus (provira...   | <u>731</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 4559236 gb AF111171.1 AF111171</a>     | Bovine leukemia virus pol...        | <u>724</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 3171246 gb AF067081.1 AF067081</a>     | Bovine leukemia virus env...        | <u>724</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 210778 gb M35240.1 BLVENVC</a>         | Bovine leukemia virus (isolat...    | <u>724</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 210776 gb M35239.1 BLVENVB</a>         | Bovine leukemia virus (isolat...    | <u>716</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 9739119 gb AF257515.1 AF257515</a>     | Bovine leukemia virus, co...        | <u>708</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 2920795 dbj D00647.1 BLVGPE</a>        | Bovine leukemia virus genomi...     | <u>708</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 1911737 gb S83530.1 S83530</a>         | env {provirus} [Bovine leukem...    | <u>700</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 210782 gb M35242.1 BLVENVE</a>         | Bovine leukemia virus (isolat...    | <u>700</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 210767 gb K02120.1 BLVCG</a>           | Bovine leukemia virus (proviral...  | <u>692</u> | 0.0     |
| <a href="#">gi 1843584 gb U87872.1 BLU87872</a>       | Bovine leukemia virus isola..       | <u>630</u> | e-178   |
| <a href="#">gi 2257975 gb AF007763.1 AF007763</a>     | Bovine leukemia virus str..         | <u>547</u> | e-153   |
| <a href="#">gi 2257977 gb AF007764.1 AF007764</a>     | Bovine leukemia virus str..         | <u>543</u> | e-152   |
| <a href="#">gi 1843586 gb U87873.1 BLU87873</a>       | Bovine leukemia virus isola..       | <u>486</u> | e-135   |
| <a href="#">gi 1843582 gb U87871.1 BLU87871</a>       | Bovine leukemia virus isola..       | <u>482</u> | e-133   |
| <a href="#">gi 210780 gb M35241.1 BLVENVD</a>         | Bovine leukemia virus (isolat..     | <u>64</u>  | 9e-08   |
| <a href="#">gi 14389323 gb AC087218.2 AC087218</a>    | Rattus norvegicus clone ...         | <u>42</u>  | 0.32    |
| <a href="#">gi 10862754 emb AL353745.7 AL353745</a>   | Human DNA sequence from...          | <u>42</u>  | 0.32    |
| <a href="#">gi 14010928 gb AC010742.4 AC010742</a>    | Homo sapiens BAC clone R...         | <u>40</u>  | 1.3     |
| <a href="#">gi 14581449 gb AY028080.1 </a>            | Mus musculus pericentriolar mate... | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 14579804 gb AC027465.6 AC027465</a>    | Homo sapiens, clone RP11...         | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 13877227 gb AC079832.16 AC079832</a>   | Mus musculus clone rp23...          | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 14327713 gb AC078911.11 AC078911</a>   | Mus musculus Strain C57...          | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 13677175 gb AC016776.6 AC016776</a>    | Homo sapiens clone RP11-...         | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 13470131 gb AC084213.19 AC084213</a>   | Mus musculus 1 BAC RP23...          | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 4508129 gb AC005538.2 AC005538</a>     | Homo sapiens BAC clone RP...        | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 9885831 gb AF294265.1 AF294265</a>     | Mus musculus galanin rece...        | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 12743807 emb AL365322.10 AL365322</a>  | Mouse DNA sequence fro...           | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 7321164 emb AL031661.28 HS404H4</a>    | Human DNA sequence from ...         | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 10185444 emb AL138836.15 AL138836</a>  | Human DNA sequence fro...           | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 11875984 emb AL049629.28 HSJ541C22</a> | Human DNA sequence fr...            | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 3493326 gb AC005568.1 AC005568</a>     | Homo sapiens chromosome 1...        | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 7630118 emb AL049866.2 MM437P9</a>     | Mus musculus chromosome X...        | <u>38</u>  | 4.9     |
| <a href="#">gi 202861 gb M93017.1 RATALTSPLA</a>      | Rat alternatively spliced ...       | <u>38</u>  | 4.9     |

Figura 9 – Resultado do BlastN das amostras sequenciadas.

BLASTP 2.2.1 [Apr-13-2001]

Color Key for Alignment Scores



Query= (145 letters)  
Database: nr 727,771 sequences; 230,545,999 total letters

| Sequences producing significant alignments:                                    | Score<br>(bits) | E<br>Value |
|--|-----------------|------------|
| <a href="#">gi 9739122 gb AAF97918.1</a> (AF257515) env [Bovine leukemia v...  | 259             | 5e-69      |
| <a href="#">gi 1911738 gb AAB50825.1</a> (S83530) env [Bovine leukemia vir...  | 258             | 8e-69      |
| <a href="#">gi 119403 sp P25505 ENV BLVAV</a> ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [CO... | 255             | 6e-68      |
| <a href="#">gi 119401 sp P25504 ENV BLVAF</a> ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [CO... | 254             | 1e-67      |
| <a href="#">gi 3171247 gb AAC18396.1</a> (AF067081) envelope glycoprotein;...  | 254             | 1e-67      |
| <a href="#">gi 119406 sp P03380 ENV BLVJ</a> ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [CON... | 254             | 2e-67      |
| <a href="#">gi 119402 sp P25057 ENV BLVAU</a> ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [CO... | 253             | 2e-67      |
| <a href="#">gi 9626229 ref NP_056899.1</a> gPr/2 [Bovine leukemia virus] >...  | 253             | 3e-67      |
| <a href="#">gi 119405 sp P25507 ENV BLVB5</a> ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [CO... | 252             | 6e-67      |
| <a href="#">gi 119404 sp P25506 ENV BLVB2</a> ENV POLYPROTEIN PRECURSOR [CO... | 251             | 8e-67      |
| <a href="#">gi 4559237 gb AAD22946.1</a> (AF111171) polyprotein; gp51 [Bov...  | 249             | 4e-66      |
| <a href="#">gi 226328 prf  1506533A</a> envelope glycoprotein gp51 [Bovine ... | 247             | 1e-66      |
| <a href="#">gi 1843585 gb AAB86908.1</a> (U87872) envelope protein [Bovine...  | 221             | 2e-57      |
| <a href="#">gi 2257976 gb AAB86914.1</a> (AF007763) envelope protein gp51 ...  | 194             | 2e-49      |
| <a href="#">gi 1843583 gb AAB86907.1</a> (U87871) envelope protein [Bovine...  | 173             | 3e-43      |
| <a href="#">gi 1843587 gb AAB86909.1</a> (U87873) envelope protein [Bovine...  | 170             | 3e-42      |
| <a href="#">gi 11263309 pir  A81050</a> exodeoxyribonuclease V 125 kD polyp... | 32              | 1.8        |
| <a href="#">gi 11263307 pir  D81826</a> exodeoxyribonuclease V (EC 3.1.11.5... | 32              | 2.0        |
| <a href="#">gi 554620 gb AAA42792.1</a> (M35241) envelope glycoprotein (en...  | 30              | 5.8        |
| <a href="#">gi 386754 gb AAA35930.1</a> (M32295) melanocyte-specific secre...  | 30              | 6.3        |
| <a href="#">gi 7510430 pir  T27353</a> hypothetical protein Y70C5C.5 - Caen... | 30              | 6.4        |
| <a href="#">gi 2135613 pir  I38400</a> melanoma-associated ME20 antigen (me... | 30              | 6.6        |
| <a href="#">gi 190106 gb AAA60121.1</a> (M77348) Pmel 17 protein [Homo sap...  | 30              | 6.6        |
| <a href="#">gi 5902084 ref NP_008859.1</a> silver (mouse homolog) like; Me...  | 30              | 6.7        |
| <a href="#">gi 547230 gb AAB31176.1</a> melanoma antigen gp100 [human, bro...  | 30              | 6.9        |
| <a href="#">gi 106977 pir  A41234</a> melanocyte-specific protein Pmel-17 p... | 30              | 6.9        |
| <a href="#">gi 1142636 gb AAB19181.1</a> (U20093) Pmel 17 [Homo sapiens]       | 30              | 7.0        |

Figura 10 – Resultado do BlastP das amostras sequenciadas.

CLUSTALW (S8) multiple sequence alignment

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| KO2120   | GCAGATCGGTTCCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCGATCAAGGATCCTTT   | 60  |
| AF399703 | GCAGATCGCTCCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCCAATCAAGGATCCTTT   | 60  |
| AF399704 | GAAAGATCGCCCGACTGCCCCACTGGGACAATGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTT   | 60  |
| AF399702 | GCAGATCGCTCCGACTGCCCCACTGGGACAACGCCTCCCAGGCCGATCAAGGATCCTTT   | 60  |
| KO2120   | TATGTCAATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTA   | 120 |
| AF399703 | TATGTCAATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTA   | 120 |
| AF399704 | TATGTGCATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTTTA   | 120 |
| AF399702 | TATGTGCATCATCAGATTTTATTCTGCATCTCAAACAATGTCATGGAATTTTCACTCTA   | 120 |
| KO2120   | ACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAGATCCCTGAT | 180 |
| AF399703 | ACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGAT  | 180 |
| AF399704 | ACCTGGGAAATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAGATCCCTGAT | 180 |
| AF399702 | ACCTGGGAGATATGGGGATATGATCCCCTGATCACCTTTTCTTTACATAAAATCCCTGAT  | 180 |
| KO2120   | CCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGTTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGG  | 240 |
| AF399703 | CCCCCTCAACCCGACTTTCCCCAGCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGG  | 240 |
| AF399704 | CCCCCTCAACCCGACTTCCCTCAGCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGG  | 240 |
| AF399702 | CCCCCTCAACCTGACTTCCCTCAGCTGAACAGTGACTGGGTTCCCTCTGTCAGATCATGG  | 240 |
| KO2120   | GCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCT   | 300 |
| AF399703 | GCCTGCTTTTAAATCAAACAGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCT   | 300 |
| AF399704 | GCCTGCTTTTAAATCAGACGGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCT   | 300 |
| AF399702 | GCCTGCTTCTAAATCAAACGGCACGGGCCTTCCCAGACTGTGCTATATGTTGGGAACCT   | 300 |
| KO2120   | TCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGGACCC  | 360 |
| AF399703 | TCCCCTCCCTGGGCTCCAGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGCACCC  | 360 |
| AF399704 | TCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAACAAAACCATCTCCAGCTCTGCACCC  | 360 |
| AF399702 | TCCCCTCCCTGGGCTCCCGAAATATTAGTATATAAATAAAACCATCTCCAGCTCTAGACCC | 360 |
| KO2120   | GGCTCGCCCTCCGGGACGCCAAATCTTCTGGGTCAACTCGTCCCTCGTTTAAACACCACC  | 420 |
| AF399703 | GGCTCGCCCTCCGGGACGCCAAATCTTCTGGGTCAACACGTCCTCGTTTAAACACCACC   | 420 |
| AF399704 | GGCTCGCCCTCCGGGACGCAAAATCTTCTGGGTCAACACGTCCTTGTTTAAACACCACC   | 420 |
| AF399702 | GGTCTCGCCCTCCGGGACGCCAAATCTTCTGGGTAAACACGTCCTTGTTTAAACACCACC  | 420 |
| KO2120   | CAAGGATGGCACCACCC   | 437 |
| AF399703 | CAAGGATGGAACCACCC   | 437 |
| AF399704 | CAAGGACGAACCACCC  | 437 |
| AF399702 | CAAGGATGGCACCACCC   | 437 |

Figura 11 – Alinhamento de três seqüências amplificadas pela PCR, com uma seqüência japonesa do vírus da LEB depositada no GenBank. As letras em vermelho representam nucleotídeos substituídos, levando em consideração a seqüência K02120.



Figura 12 – Alinhamento de três seqüências previstas de aminoácidos, com uma seqüência de japonesa. As letras em vermelho representam aminoácidos substituídos, levando em consideração a seqüência K02120.

#### 4-4 COMPARAÇÃO ENTRE PCR E IDGA NA IDENTIFICAÇÃO DE ANIMAIS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEB

Das 65 amostras testadas, 27 (41,5%) foram positivas pela PCR e IDGA, 13 (20,0%) amostras apresentaram resultado positivo pela

PCR e negativo pela IDGA, 21 (32,3%) foram negativas à PCR e à IDGA e quatro (6,2%) positivas à IDGA e negativas à PCR (Tab. 2). Houve uma concordância de 73,8% entre a PCR e a IDGA. O valor da estatística kappa ( $\kappa$ ) foi de 0,48 demonstrando alinhamento moderado entre os testes.

Tabela 2 – Comparação entre PCR e IDGA na detecção do vírus da LEB.

|              | IDGA positiva | IDGA negativa | Total |
|--------------|---------------|---------------|-------|
| PCR positiva | 27            | 13            | 40    |
| PCR negativa | 4             | 21            | 25    |
| Total        | 31            | 34            | 65    |

*Kappa=0,48*

A IDGA detecta a resposta indireta à infecções pelo vírus da LEB, já a PCR detecta diretamente o genoma do vírus, que encontra-se integrado ao genoma bovino. Portanto ao comparar-se as duas técnicas é esperado que encontre-se resultados divergentes.

Os resultados encontrados no presente estudo confirmam resultados anteriores que demonstraram uma maior sensibilidade da PCR, quando comparada à IDGA (Naif et al., 1990; Kuzmak et al., 1993; Blankenstein et al., 1998). A comparação dos resultados obtidos pela PCR e pela IDGA foi realizada pela estatística kappa ( $\kappa$ ), que é indicada quando se comparam testes e

não há a presença de um padrão ouro (Smith, 1995). Embora a OIE reconheça a IDGA e os testes de ELISA como as provas oficiais de diagnóstico da LEB, é notório que a PCR é uma técnica altamente sensível e se considerássemos a IDGA como padrão ouro para comparação com a PCR, os resultados dessa poderiam estar subestimados.

Em alguns trabalhos obteve-se 100% de concordância entre PCR e IDGA (Ballagi-Pordany et al., 1992; Sherman et al., 1992; Kuzmak et al., 1993; Dube et al., 1997), o que provavelmente é devido ao pequeno número de amostras testadas, 22, 18, 33 e 8,



respectivamente, ou ao desenvolvimento de PCR mais sensíveis, que a desenvolvida no presente trabalho. Naif et al. (1990), testando 63 animais, conseguiram detectar todos animais soropositivos e um soronegativo utilizando PCR simples.

A PCR desenvolvida deixou de identificar apenas quatro animais que foram positivos pela IDGA, mas identificou outros 13 que eram negativos à IDGA.

Existem várias hipóteses para explicar a não identificação pela PCR de quatro animais soropositivos. Embora os iniciadores utilizados no presente trabalho tenham sido selecionados de regiões conservadas do gene *env*, após o estudo de seqüências publicadas (Rice et al., 1984, Sagata et al., 1985, Mamoun et al., 1990), é possível que variações genéticas no provírus possam ter dificultado o anelamento dos iniciadores (Fechner et al., 1996). Marsolais et al. (1994), postularam sensibilidade da PCR, variando de 50 a 90%, dependendo da origem geográfica das amostras, é devido a variações genéticas no provírus.

O pequeno número de linfócitos infectados (Murtaugh et al., 1991; Eaves et al., 1994; Reichel et al., 1998), o pequeno número de cópias do provírus nos linfócitos infectados (Molloy et al., 1994), a infecção restrita à órgãos linfóides (Klintevall et al., 1994), tal como foi descrita em pacientes HIV positivos (Edginton, 1993), reações cruzadas com outros retrovírus na sorologia e a presença de inibidores da Taq DNA polimerase nas amostras de DNA (Panaccio e Lew, 1991; Rolfs et al., 1992), são outras prováveis causas para a não identificação de todos animais soropositivos pela PCR.

A presença de animais PCR positivos e IDGA negativos podem ser considerados como falso positivos na PCR ou falso negativos na IDGA. Todas as precauções possíveis foram tomadas para evitar a ocorrência de contaminações na PCR. A extração do DNA foi realizada em local

livre de produtos amplificados, evitou-se contaminação, com troca de luvas e aventais e além disso, em todas as baterias de testes foram usados controles (Água e DNA de células MDBK) que permaneceram negativos.

Entre as causas de falso negativos na IDGA estão o intervalo entre infecção e detecção de anticorpos (Dinter, 1989; De Boer et al., 1987), coleta próxima à data do parto (Ebertus et al., 1987), presença de animais persistentemente infectados pelo vírus da DBV (Roberts et al., 1988, 1989) e falha na resposta imune humoral (Klintevall et al., 1994). Nenhum dos animais coletados havia parido em datas próximas ao dia da coleta (dados não mostrados).

Fechner et al. (1997), estudando variações genéticas na região *env* encontraram uma relação entre o padrão de restrição, utilizando várias enzimas de restrição, e formas atípicas da infecção em bovinos, em que foram observadas atraso e diminuição na resposta imune.

O estágio da infecção, de relações hospedeiro-vírus, incluindo o número de células infectadas ou o número de cópias do provírus por célula, a regulação da expressão de antígenos virais, a indução da resposta imune humoral e a proliferação de linfócitos, influenciam a detecção direta e/ou indireta de infecções pelo vírus da LEB.

Devido ao pequeno número de amostras coletadas, por faixa etária, não pode-se determinar se existe associação entre o resultados dos testes de diagnóstico e a idade dos bovinos. Entretanto na faixa etária III, observou-se que a maior parte dos animais apresentaram resultados concordantes (IDGA+/PCR+), o que é provavelmente devido à maior frequência de infecções nos animais mais velhos. Já a faixa etária I apresentou o maior número de animais com resultados discordantes (IDGA-/PCR+), o que pode ser explicado por estes animais terem sido infectados recentemente (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados da IDGA e PCR segundo a faixa etária dos animais examinados

| Faixa etária | IDGA+/PCR+ | IDGA+/PCR- | IDGA-/PCR+ | IDGA-/PCR- | TOTAL |
|--------------|------------|------------|------------|------------|-------|
| I            | 0          | 2          | 6          | 5          | 13    |
| II           | 6          | 0          | 4          | 12         | 22    |
| III          | 21         | 2          | 3          | 4          | 30    |
| TOTAL        | 27         | 4          | 13         | 21         | 65    |

A PCR pode ser utilizada como técnica auxiliar no diagnóstico da LEB, por exemplo nos casos em que se deseja determinar se existe infecção em bezerros que receberam colostro de vacas soropositivas, para encontrar animais infectados com baixos títulos de anticorpos, títulos transientes ou sem títulos de anticorpos para o vírus da LEB (Cockerell e Rovnak, 1988; Ballagi-Pordany et al., 1992; Burkhardt et al., 1993; Eaves et al., 1994), em animais infectados recentemente (Naif et al., 1992; Kelly et al., 1993), em casos de dúvida quanto ao resultado da IDGA. Em casos em que for necessário determinar o diagnóstico em um prazo mais curto, o resultado da PCR pode ser obtido em menos de 24 horas, contra no mínimo 72 horas da IDGA. A PCR pode ser aplicada em programas de erradicação, principalmente na fase final destes programas, em que o número de animais infectados é baixo, em animais destinados ao comércio internacional, e na seleção de animais para programas de premunicação.

Os resultados desse trabalho demonstraram que a utilização de uma sorologia simples pode levar a falhas no diagnóstico da LEB e que a IDGA deve estar associada a outras provas de diagnóstico para aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da LEB.

### 5 CONCLUSÕES

- A PCR desenvolvida pode ser utilizada na detecção do vírus da LEB em amostras de DNA extraídas a partir de sangue total de bovinos soropositivos e soronegativos.
- A PCR padronizada é específica e sensível na detecção de infecções pelo vírus da LEB.
- As regiões do gene *env* seqüenciadas apresentaram um alto grau de conservação.

- A PCR e a IDGA apresentaram concordância moderada, na detecção de infecções pelo vírus da LEB, entretanto são técnicas que devem ser utilizadas de forma complementar, para aumentar a eficiência do diagnóstico.

### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRESTI, A.; PONTI, W.; ROCCHI, M. et al. E. Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.*, v.54, n.3, p.373-378, 1993.
- BALLAGI-PORDÁNY, A.; KLINTEVALL, K.; MERZA, M. et al. Direct detection of bovine leukemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J. Vet. Med. B.*, v.39, n.1, p.69-77, 1992.
- BELÁK, S.; BALLAGI-PORDÁNY, A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet. Res. Comm.*, v.17, n.1, p.55-72, 1993.
- BLANKENSTEIN, P.; FECHNER, H.; LOOMAN AC. et al. Polymerase kettenreaktion (PCR) zum nachweis von BLV provirus praktikable ergänzung der BLV diagnostik? *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, v.111, n.5, p.180-186, 1998.
- BRANDON, RB.; NAIF, H.; DANIEL, RCW. et al. Early detection of bovine leukosis virus DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, v.50, n.1, p.89-94, 1991.

- BURKHARDT, H.; FECHNER, H.; MEWES, G. et al. Search with capture-ELISA, nucleic acid probes and DNA-amplification for BLV in a AGID seronegative cattle herd in a long term study. **FEBS Meeting**, 22. 1993. Stockholm, Sweden.
- BURNY, A.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R. et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. **Vet. Microbiol.**, v.17, n.3, p.197-218, 1988.
- CAMARGOS, MF.; FOSCOLO, CB.; PELLEGRIN, AO. et al. Frequência de anticorpos para o vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em bovinos pantaneiros do Núcleo de Conservação da Fazenda Nhumirim – EMBRAPA Pantanal. In: SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO SOBRE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS, 1., 2000, Corumbá. **Anais....Corumbá**, 2000. p.32.
- CASTRO, RS.; LEITE, RC.; ABREU, JJ. et al. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implications in international embryo trade. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v.24, n.3, p.173-176, 1992.
- COCKERELL, GL.; ROVNAK, J. The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle. **Leuk. Res.**, v.12, n.6, p.465-469, 1988.
- COULSTON, J.; NAIF, H.; BRANDON, R. et al. Molecular cloning and sequencing of an Australian isolate of proviral bovine leukaemia virus DNA: comparison with other isolates. **J. Gen. Virol.**, v.71, n.8, p.1737-1746, 1990.
- D'ANGELINO, JL.; GARCIA, M.; BIRGEL, EH. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Trop. Anim. Hlth. Prod.**, v.30, n.1, p.13-15, 1998.
- DE BOER, GF.; BOERRIGTER, HM.; GROEN, J. et al. Identification of bovine leukemia virus (BLV) infected cattle by complex-trapping-blocking (CTB) ELISA employing monoclonal antibodies directed against BLV-p24. **J. Vet. Med. B.**, v.34, n.10, p.717-728, 1987.
- DEACON, NJ.; LAH., M. The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. **Aust. Vet. J.**, v.66, n.12, p.442-444, 1989.
- DINTER, Z. Enzootic bovine leucosis, diagnostic virology. In: J. Moreno-Lopez (Ed.). **A review of methods at the National Veterinary Institute**. 1989, p.115-122.
- DUBE, S.; BACHMAN, S.; SPICER, T. Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus *pol* DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. **J. Gen. Virol.**, v.78, n.6, p.1389-1398, 1997.
- DUBE, S.; DOLCINI, G.; ABBOT, L. et al. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. **Virology**, v.277, n.2, p.379-386, 2000.
- EAVES, FW.; MOLLOY JB.; DIMMOCK CK. et al. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukemia virus proviral DNA in cattle. **Vet. Microbiol.**, v.39, n.3-4, p.313-321, 1994.
- EBERTUS, R.; STARICK, E.; WITTMANN, W. Untersuchungen über Titerbewegungen von Antikörpern gegen das bovine Leukosevirus im Blutserum und im Eutersekret bei Kühen und Färsen im perinatales Zeitraum. **Arch. Exper. Vet. Med.**, v.41, n.5, p.732-737, 1987.
- EDGINTON, SM. HIV is no longer latent, says NIAID's Fauci. **Bio/Technol.**, v.11, p.16-17, 1993.
- FECHNER, H.; KURG, A.; BLANKENSTEIN, P. et al. Direct use of cell lysates in PCR-based diagnosis of bovine leukemia virus infection. **Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.**, v.109, n.11-12, p.446-450, 1996.

FECHNER, H.; BLANKENSTEIN, P.; LOOMAN, AC. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. **Virology**, v.237, n.2, p.261-269, 1997.

FIELDS, BN.; KNIPE, DM. **Virology**. New York: Raven Press, 2336p, 1990.

GENTILE, G; CAPORALE, V.; MAC CALLON, W. Beobachtungen und Ergebnisse eines in Italien geprüften Programmes zu Bekämpfung der enzootischen Leukose des Rindes. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.**, v.92, n.10, p.357-361, 1985.

GONZÁLEZ, ET.; NORIMINE, J.; VALERA, AR. et al. A rapid and sensitive diagnosis of bovine leukemia virus infection using the nested shuttle polymerase chain reaction. **Pesq. Vet. Bras.**, v.19, n.2, p.63-67, 1999.

THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). Acessado em, 30/09/2001, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/overview/dnaandrna.html>.

JACOBS, RM.; SONG, Z.; POON, H. et al. Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. **Can. J. Vet. Res.**, v.56, n.4, p.339-348, 1992.

JOHNSON, R.; KANEENE, JB. Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. **Vet. Bull.**, v.62, p.287-312, 1992.

KAADEN, OR; LANGE, S.; ROMANOWSKI, W. et al. Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. **Zbl. Vet. Med. B.**, v.29, n.4, p.269-274, 1982.

KELLY, EJ.; JACKSON, MK.; MARSOLAIS, G. et al. Early detection of bovine leukemia virus in cattle by use of the polymerase chain reaction. **Am. J. Vet. Res.**, v.54, n.2, p.205-209, 1993.

KETTMANN, R.; CLEUTER, Y.; MAMMERICKX, M. et al. Genomic integration of bovine leukemia provirus: Comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v.77, n.5, p.2577-2581, 1980.

KLINTEVALL, K.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; NÄSLUND, K. et al. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. **Vet. Microb.**, v.42, n.2-3, p.191-204, 1994.

KUZMAK, J.; SKORUPSKA, A.; MOUSSA, A. et al. Application of non-radioactive method of DNA detection in the diagnosis of bovine leukemia virus infection. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v.37, p.3-8, 1993.

MAMOUN, RZ.; MORISSON, M.; REBEYROTTE, N. et al. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. **J. Virol.**, v.64, n.9, p.4180-4188, 1990.

MARSOLAIS, G.; DUBUC, R.; BERGERON, J. et al. Importance of primer selection in the application of PCR technology to the diagnosis of bovine leukemia virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.6, n.3, p.297-301, 1994.

MERCKT, H; GIUDICE, JQ.; MULLER, JA. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio Grande do Sul. **Rev. Esc. Agr. Vet. R.S.**, v.2, p.7-19, 1959.

MILLER, JM. Virus-like particles in phytohaemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **J. Nat. Canc. Inst.**, v. 43, p. 1297-1395, 1969.

MILLER, JM.; VAN DER MAATEN, MJ. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. **Eur. J. Cancer**, v.13, n. 12, p.1369-175, 1977.

- MILLER, JM.; SCHMERR, MJF.; VAN DER MAATEN, MJ. Comparison of four serologic tests for the detection of antibodies to bovine leukemia virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.42, n.1, p.5-8, 1981.
- MIRSKY, ML.; DA, Y.; LEWIN, HA. Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. **PCR Meth. App.**, v.2, n.4, p.333-340, 1993.
- MODENA, CM.; GOUVEIA, AMG.; AZEVEDO, NA. et al. Leucose enzoótica bovina: I- Prevalência em rebanhos de alta linhagem no Estado de Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.36, p.39-45, 1984.
- MOLLOY, JB.; DIMMOCK, CK.; EAVES, FW. et al. Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. **Vet. Microb.**, v.39, n.3-4, p.323-333, 1994.
- MOLNAR, E.; MOLNAR, L.; DIAS, HT. et al. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.19, p.7-11, 1999.
- MOLTENI, E.; AGRESTI, A.; MENEVERI, R. et al. Molecular characterization of a variant of proviral bovine leukaemia virus (BLV). **J. Vet. Med. B**, v.43, n.4, p.201-211, 1996.
- MORAES, MP.; WEIBLEN, R.; FLORES, EF. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.26, p.257-262, 1996.
- MURTAUGH, MP.; LIN, GF.; HAGGARD, DL. et al. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, v.33, n.1-2, p.73-85, 1991.
- NAIF, HM.; BRANDON, RB.; DANIEL, RCW. et al. Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.25, n.2-3, p.117-129, 1990.
- NAIF, HM.; DANIEL, RCW.; COUGLE, WG. et al. Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, n.3, p.675-679, 1992.
- OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE). Acessado em 30/09/2001. [http://www.oie.int/csp/info/cs\\_bdd.htm](http://www.oie.int/csp/info/cs_bdd.htm).
- PANNACIO, M.; LEW, A. PCR based diagnosis in the presence of 8%(v/v) blood. **Nucleic Acids Res.**, v.19, p.1151, 1991.
- PORTETELLE, D.; DANDOY, C.; BURNBY, A. et al. Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. **Virology**, v.169, n.1, p.34-41, 1989.
- RANGEL, NM.; MACHADO, AV. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. **Arq. Esc. Sup. Vet. MG**, v.1, p.83-96, 1943.
- REICHEL, MP.; THAM, KM.; BARNES, S. et al. Evaluation of alternative methods for the detection of bovine leukaemia virus in cattle. **N. Z. Vet. J.**, v.46, p.140-146, 1998.
- RICE, NR.; STEPHENS, RM.; COUEZ, D. et al. The nucleotide sequence of the env gene and post-env region of bovine leukemia virus. **Virology**, v.138, p.82-93, 1984.
- ROBERTS, DH.; LUCAS, MH.; WIBBERLEY, G. et al. Response of cattle persistently infected cattle bovine diarrhea virus to bovine leucosis virus. **Vet. Rec.**, v.122, n.13, p.293-296, 1988.
- ROBERTS, DH.; LUCAS, MH.; SWALLOW, C. Comparison of the agar gel immunodiffusion test and ELISA in the detection of bovine leukosis virus antibody in cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. **Vet. Immunopathol. Immunol.**, v.22, n.3, 275-281, 1989.

ROLFS, A.; SCHULLER, I.; FINCKH, U. et al. **PCR: Clin. Diag. Res.**, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1992. p.35.

SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; TSUZUKU-KAWAMURA, J. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.82, n.3, p.677-681, 1985.

SAMPAIO, IBM. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SCHWARTZ, I.; BENSALD, A.; POLACK, B. et al. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **J. Virol.**, v.68, n.7, p.4589-4596, 1994.

SHERMAN, MP.; EHRLICH, GD.; FERRER, JF. et al. Amplification and analysis of specific DNA and RNA sequences of bovine leukemia virus from infected cows by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microb.**, v.30, n.1, p.185-191, 1992.

SIMARD, C.; RICHARDSON, S.; DIXON, P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. **Can. J. Vet. Res.**, v.64, n.2, p.101-106, 2000.

SMITH, RD. **Veterinary clinical epidemiology**. London: CRC Press, 1995. 279p.

TOMA, B.; ELOIT, M.; SAVEY, M. Las enfermedades animales por retrovirus: leucosis bovina enzoótica, anemia infecciosa de los équidos, artritis/encefalitis caprina. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.9, n.4, p.1077-1119, 1990.

VAN DER MAATEN, MJ.; MILLER, JM. Replication of bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. **Bibl. Haematol.**, v.43, p.360-362, 1976.

ANEXO 1: Sequências dos fragmentos amplificados pela PCR e depositados no GenBank

```
LOCUS   AF399702   437 bp   DNA       VRL     13-AUG-2001
DEFINITION   Bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds.
ACCESSION   AF399702
KEYWORDS
SOURCE     Bovine leukemia virus.
  ORGANISM   Bovine leukemia virus
             Viruses; Retroid viruses; Retroviridae; Deltaretrovirus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 437)
  AUTHORS   Camargos,M.F., Rocha,M.A., Leite,R.C., Stancek,D. and Reis,J.K.P.
  TITLE     Detection of Bovine Leukemia Virus by a PCR assay
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 437)
  AUTHORS   Camargos,M.F., Rocha,M.A., Leite,R.C., Stancek,D. and Reis,J.K.P.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (14-JUL-2001) Veterinary Preventive Medicine, Veterinary
             School Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627,
             Belo Horizonte, MG 30270-010, Brazil
FEATURES   Location/Qualifiers
  source    1..437
             /organism="Bovine leukemia virus"
             /proviral
             /specific_host="Holstein cow"
             /db_xref="taxon:11901"
             /country="Brazil: Minas Gerais State, Zona da Mata Region"
             /note="isolated from blood leukocytes"
  CDS       <1..>437
             /codon_start=1
             /product="envelope glycoprotein gp51"
             /translation="ADRSDCPHWDNASRADQGSFYVDHQILFLHLKQCHGLFTLTWEI
WGYDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPS
PWAPEILVYNKTISSSRPGLALPDAQIFWVNTSLFNNTTQGWHP"
BASE COUNT  99 a 145 c 81 g 112 t
ORIGIN
  1  gcagatcgct cegactgccc ccactgggac aacgcctccc gggecgatca aggatccttt
  61  tatgtcgatc atcagatftt affectgcat ctcaacaat gtcattgact ttcacccta
  121  acctgggaga tatggggata tgateccctg atcacctftt cttfacataa aatccctgat
  181  cccctcaac ctgactccc teagetgaac agtgactggg tccctctgt cagatcatgg
  241  gccctgcttc taatcaaac ggcacgggcc tccccgact gtctatag ttgggaacct
  301  tccctccc gggetcccga aatattagta tataataaaa ccatctccag ctctagacct
  361  ggtctgccc tccggagc ccaaatctc tgggtaaca cgtcttgt taacaccac
  421  caaggatgac accacc
```

13-AUG-2001

LOCUS AF399703 437 bp DNA VRL 13-AUG-2001

DEFINITION Bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds.

ACCESSION AF399703

KEYWORDS

SOURCE Bovine leukemia virus.

ORGANISM Bovine leukemia virus

Viruses; Retroviral viruses; Retroviridae; Deltaretrovirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 437)

AUTHORS Camargos,M.F., Rocha,M.A., Leite,R.C., Stancek,D. and Reis,J.K.P.

TITLE Detection of Bovine Leukemia Virus by a PCR assay

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 437)

AUTHORS Camargos,M.F., Rocha,M.A., Leite,R.C., Stancek,D. and Reis,J.K.P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (14-JUL-2001) Veterinary Preventive Medicine, Veterinary School Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG 30270-010, Brazil

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..437

/organism="Bovine leukemia virus"

/proviral

/specific\_host="cow"

/db\_xref="taxon:11901"

/country="Brazil: Northern Paran State"

/note="isolated from blood leukocytes"

CDS <1..>437

/codon\_start=1

/product="envelope glycoprotein gp51"

/translation="ADRSDCPHWDNASQANQGSFYVNHQILFLHLKQCHGIFTLTWEI

WGYDPLITFSLHKIPDPPQPDFPQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPSPPWAPEILVYNKTISSAPGLALPDAQIFWVNTSSFNTTQGWNHP"

BASE COUNT 106 a 144 c 77 g 110 t

ORIGIN

1 gcagatgct cegactgecc ccactgggac aatgcctccc aggccaatca aggatectff  
61 tatgtcaate atcagatfff atctctgat ctaaacaat gtcattggaat ttcaacteta  
121 acctgggaga tatggggata tgatccccg atcactttt ctffacataa aatecctgat  
181 cccctcaac cegacttccc caagctgaac atgactggg ttccctctgt cagatcatgg  
241 gcccctgttt taatcaaac agcacgggccc tcccagact gtctatfatg ttgggaacct  
301 tccccccct gggetccaga aatattagta tatacaaaa ccatctccag ctctgcacc  
361 ggcctcgecc tcccggagc ccaatcttc tgggtcaaca cgtctctgtt taacaccacc  
421 caaggatgga accacc



LOCUS AF399704 437 bp DNA VRL 13-AUG-2001  
 DEFINITION Bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51 gene, partial cds.  
 ACCESSION AF399704  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bovine leukemia virus.  
 ORGANISM Bovine leukemia virus  
 Viruses; Retroid viruses; Retroviridae; Deltaretrovirus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 437)  
 AUTHORS Camargos,M.F., Rocha,M.A., Leite,R.C., Stancek,D. and Reis,J.K.P.  
 TITLE Detection of Bovine Leukemia Virus by a PCR assay  
 JOURNAL Unpublished  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 437)  
 AUTHORS Camargos,M.F., Rocha,M.A., Leite,R.C., Stancek,D. and Reis,J.K.P.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (14-JUL-2001) Veterinary Preventive Medicine, Veterinary  
 School Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627,  
 Belo Horizonte, MG 30270-010, Brazil  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..437  
 /organism="Bovine leukemia virus"  
 /proviral  
 /specific\_host="cow"  
 /db\_xref="taxon:11901"  
 /country="Brazil: Minas Gerais State"  
 /note="isolated from blood leukocytes"  
 CDS 1..437  
 /codon\_start=1  
 /product="envelope glycoprotein gp51"  
 /translation="EDRPDCPHWDNASQADQGSFYVDHQILFLHLKQCHGIFTLTWEI  
 WGYDPLITFSLHKIPDPQPDPFQLNSDWVPSVRSWALLLNQTARAFPDCAICWEPS  
 PWAPEILVYNKTISSAPGLALPDAKIFWNTSLFNTTQGRNHP"  
 BASE COUNT 105 a 143 c 80 g 109 t  
 ORIGIN  
 1 gaagatgcc cgaactgccc ccaactgggac aatgectccc aggecgatca aggatcctt  
 61 tatgtgata atcagatttt atctctgat ctcaaacat gtcattggaat ttcaactta  
 121 acctgggaaa tatggggata tgacccctg atcaactttt cttfacataa gatccctgat  
 181 cccctcaac cgaactccc tcactgaac agtgactggg tccctctgt cagatcatgg  
 241 gccctgcttt taatcagac ggcacgggccc tcccagact gtgctatag ttgggaacct  
 301 tccctccc gggetcccga aatattagta tataacaaa ccatcccag ctctgaccc  
 361 ggcctgccc tccggagc aaaaatctt tgggtcaaca cgtcttgtt taacaccac  
 421 caaggacga accacc