

Gissandra Farias Braz

**LENTIVIRUS DE PEQUENOS RUMINANTES:
CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E ANTIGÊNICA DE ISOLADOS
DE CAPRINOS E OVINOS DO BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2013**

B8271 Braz, Gissandra Farias, 1976-
Lentivírus de pequenos ruminantes: caracterização genética e antigênica de isolados de caprinos e ovinos do Brasil / Gissandra Farias Braz. – 2013.

79 p. : il.


Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Caprino – Doenças – Teses. 2. Ovino – Doenças – Teses. 3. Lentivírus – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.390 89

Tese defendida e aprovada em 20 de maio de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente


Dr. Marcelo Fernandes Camargos


Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior


Dr. Graciela Kunrath Lima


Prof. Marcos Bryan Heinemann

Meus pais, Maria e José,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais pela confiança, apoio, amor, incentivo, força e conselhos.

As minhas irmãs Gislane, Giselma, Gisleide, Dyana, e Graciéla, pelo apoio, amizade, alegria, incentivo e carinho.

Aos meus sobrinhos Tháfyne, Letícia, Gustavo e Deyvisson pelos momentos de felicidade e carinho.

Ao professor Rômulo pela oportunidade, confiança e orientação.

Ao Professor Marcos Bryan Heinemann, pelo apoio, paciência, dedicação e amizade.

Ao Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pelo suporte científico, apoio e amizade.

A toda equipe do Retrolab em especial Ana Paula, Cairo, Paula, André, Fê, Dani, Juliana Quintanilha e João Helder pelo apoio e bons momentos compartilhados.

A Eduardo Nunes, Grazielle Cossenzo, Anita e Graciéla pelo suporte técnico, paciência e dedicação.

A Escola de veterinária da UFMG, pela contribuição à minha formação profissional.

A Cnpq pelo auxílio financeiro.

A colaboração e suporte técnico das instituições, onde uma fase experimental deste projeto foi realizado:

Universidades: Universidade Federal da Bahia-UFBA, Universidade Federal do Piauí -UFPI, Universidade Federal de Pernambuco - UFRPE, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/FMVZ- Unesp-Botucatu (SP);

Instituições: EMEPA (Soledade, PB), EMPARN (Cruzeta, RN), ADAB (Salvador, BA), EBDA (Feira de Santana, BA), EMBRAPA-CNPC (Sobral, Ceará).

À Dr. Leonardo Toreão e Dalva (EMEPA), Souza jr e Kaliandra (UFPI), Serginho e Luciana Coutinho (UFRPE), Prof. Edízio (UFCG), Profa. Lygia (Unes-FMVZ), Profa Sílvia Sardi (UFBA), pelo empenho e suporte dedicado à realização deste trabalho.

La France:

À mes amis français: Pauline, Nicolas, Julia, Elodie, Jonathan, Antoine, Pékola, Marion, Pierri, Lourdinha et Adriana, pour votre soutien, les moments passés ensemble de détente et de découverte. Pour l'accueil et l'amitié inestimable.

À mes formateurs de langue française (ASFODEP): Sylvain RUELLE et Lydie BREMBOR, merci pour l'initiation à la langue française.

Je tiens à remercier également tout le personnel de l'Anses Laboratoire de Niort:

Je remercie Madame Jaqueline VIALARD pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire;

À Stephen VALAS que je remercie pour sa disponibilité, son soutien pendant mon séjour en France, sa patience ainsi que de son accompagnement pendant ma thèse, ce qui m'a permis d'enrichir mes propres connaissances;

À ma chère Sylvie, merci pour son amitié sincère, pour nos conversations en langue portugaise et aussi pour les sorties gastronomiques à Niort;

À Alain LE VEN et Benoît CROISÉ pour leur soutien et pour avoir partagé le laboratoire avec moi;

Et enfin à Isabelle PORS, Christian, Pascale LE COZ, Carine, Thierry, Cécile, Isabelle, Gaëlle, Sophie, Marie-Pierre, Pascale, Patrick et Anaïs, merci pour leur soutien et leur sympathie qui m'ont permis de passer un stage très agréable au laboratoire ANSES.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sofrer, é só uma vez;

Vencer, é para a eternidade.

Soren Kierkegaard

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1: Isolamento de amostras brasileiras de lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR)	18
RESUMO	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Animais e espécimes para o isolamento viral	19
2.2 Coleta de Dados	19
2.3 Controles.....	20
2.4 Cultivo celular primário de MSC não infectadas	20
2.5 Isolamento de LVPR.....	20
2.5.1 Isolamento viral de LVPR a partir de cultivo primário de plexo coróide e MSC.	20
2.5.2 Isolamento viral de LVPR a partir Cocultivo de leucócitos e lavado brônquio alveolar	20
2.6 Detecção de LVPR nos cultivos de tecidos.....	21
2.7 Sequenciamento	22
2.8 Análise filogenética	22
Análise estatística.....	22
3. RESULTADOS	23
3.1 Isolamento viral.....	23
3.1.1 Isolamento viral e características de cultivos.....	23
3.1.2 Associação da frequência de isolamento viral e possíveis fatores de risco	23
4. DISCUSSÃO	31
5. CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXO	37
CAPÍTULO 2: Caracterização filogenética de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos e ovinos naturalmente infectados em rebanhos brasileiros	38
RESUMO	38
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1 Amostras.....	40
2.2 Extração de DNA proviral.....	40
2.3 Amplificação proviral	40
2.3.1 Amplificação dos fragmentos dos genes <i>env</i> e <i>gag</i> pela PCR	40
2.4 Sequenciamento	41
2.5 Análise filogenética	43
2.6 Números de acesso das sequências de nucleotídeo.....	43
3. RESULTADOS	43
3.1 Análise filogenética baseadas na região SU de <i>env</i>	43
3.1.1 Análise filogenética da região V1/V2	43
3.1.1.1 Comparação das sequências.....	43
3.1.1.2 Matriz e distâncias das região V1/V2.....	44
3.1.2 Análise filogenética da região V4/V5	44
3.2 Análise filogenética baseada na região MA/CA (<i>gag</i>)	50
3.2.1 Comparação das sequências	50

33.2. Matriz de distância do gene env (CA)	50
3.2.3 Análise de aminoácidos das regiões imunodominante de MA/CA	54
4. DISCUSSÃO	57
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
Capítulo 3: Caracterização antigênica de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) por ELISA recombinante (MA/CA e SU) em rebanhos de caprinos e ovinos brasileiros.....	62
RESUMO.....	62
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 Amostras.....	65
2.2 Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)	66
2.3 Antígenos recombinantes SU1/GAG/SU5 e SU1/SU5	66
2.4 Elisa recombinante e ELISA chekit.....	66
2.5 Caracterização antigênica de soros de caprinos e ovinos por ELISA SSB1 e SS0016	67
2.6 Técnica de ELISA com proteínas recombinantes.....	67
2.7 ELISA chekit CAEV/MVV screening.....	68
2.8 Análise estatística.....	68
3. RESULTADOS.....	68
3.1 Caracterização antigênica de soros de caprinos e ovinos por ELISA de proteínas recombinantes SSB1 e SS0016	68
3.1.1 Caprinos.....	68
3.1.2 Ovinos.....	69
3.2 Caracterização molecular versus caracterização antigênica.....	69
4. DISCUSSÃO	74
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
CONCLUSÕES FINAIS	79

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1		
Tabela 1 -	Caprinos utilizados para o isolamento viral de LVPR	25
Tabela 2 -	Identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>gag</i> (412 nt) de isolados brasileiros de LVPR com CAEV cork (nBlast, Genbank).....	27
Tabela 3 -	Identidade das sequências de nucleotídeos do gene <i>env</i> (379 nt) de isolados brasileiros com CAEV cork (nBlast, Genbank).	27
Tabela 4 -	Estatística descritiva dos períodos em dias do isolamento de LVPR.....	29
Tabela 5 -	Resultado da frequência de isolamento do LVPR a partir de caprinos oriundos de rebanhos brasileiros considerando a raça.....	30
Tabela 6 -	Resultado da frequência de isolamento do LVPR de diferentes tecidos isolados de caprinos oriundos de rebanhos brasileiros considerando idade do caprino	30
Tabela 7 -	Resultado da frequência de isolamento do LVPR de diferentes tecidos isolados de caprinos oriundos de rebanhos brasileiros considerando sinais clínicos.....	30
Capítulo 2		
Tabela 1 -	Amostras sequenciadas a partir de isolados de LVPR de caprinos e PBL de caprinos e ovinos oriundos da região nordeste e sudeste do Brasil	45
Tabela 2 -	Números de acesso das sequências de LVPR brasileiras no Genbank	47
Tabela 3 -	Distâncias de nucleotídeo e aminoácidos entre as sequências de V1V2 de isolados brasileiros e os genótipos de LVPR.....	49
Tabela 4 -	Divergência de nucleotídeos e aminoácidos do gene <i>gag</i> das amostras Br1163 e Br195.	52
Tabela 5 -	Matriz de comparação das distâncias genéticas de nucleotídeos e aminoácidos entre sequências do gene <i>Gag</i> (MA/CA) e subtipos de LVPR.....	52
Tabela 6 -	Destaque dos principais achados obtidos em análise filogenética das sequências brasileiras de LVPR	55
Capítulo 3		
Tabela 1 -	Descrição de soros de caprinos e ovinos e respectivos testes diagnósticos realizados	67
Tabela 2 -	Resultados sorológicos de proteínas recombinantes SS e SGS obtidos em caprinos de rebanhos brasileiros.....	70
Tabela 3 -	Classificação antigênica de LVPR de caprinos de rebanhos brasileiros obtidos na proteína recombinante SS	70
Tabela 4 -	Soro caprinos que obtiveram reação antigênica exclusivamente para o antígeno SS0016 ou que apresentaram DO elevada em ELISA SSB1 e SS0016.....	71
Tabela 5 -	Soros de caprinos (n=70) com reatividade simultânea nas proteínas recombinantes SSB1* e SS0016** e a classificação antigênica de acordo com os critérios estabelecidos.....	72

Tabela 6 -	Classificação genética obtida no gene <i>env</i> (V1/V2 e V4/V5) e <i>gag</i> (MA/CA) e antigênica (SU1/SU5) de caprinos e ovinos naturalmente infectados com LVPR no Brasil	73
LISTA DE QUADROS		
Capítulo 1		
Quadro 1 -	Oligonucleotídeos utilizados na nested-PCR e seqüenciamento.....	21
Capítulo 2		
Quadro 1 -	Iniciadores utilizados na amplificação dos genes <i>gag</i> e <i>env</i>	42
LISTA DE ANEXO		
Capítulo 1		
Anexo 1 -	Cocultivo de Lavado brônquio alveolar	37
Anexo 2 -	Cultivo primário de membrana sinovial caprina (MSC) e Plexo coróide (PC).	37
LISTA DE FIGURAS		
Capítulo 1		
Figura 1 -	Isolados de LVPR de Caprinos (n = 42) e estados oriundos no Brasil.	28
Figura 2 -	Eletroforese duplex - nested – PCR do CAEV.....	28
Figura 3 -	Box-plot do período (dias) do isolamento viral.	29
Capítulo 2		
Figura 1	Genoma do lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR)	42
Figura 2 -	Relação filogenética de seqüências de nucleotídeos (<i>env</i>) de amostras brasileiras de LVPR de caprinos e ovinos	48
Figura 3-	Alinhamento de dedução de seqüências brasileiras e referências de SRLV de aminoácidos da região V4/V5 do gene <i>env</i> (V4V5)	51
Figura 4 -	Alinhamento de dedução de seqüências de aminoácidos de LVPR da região V4 do gene <i>env</i> (379 nt).....	52
Figura 5-	Relação Filogenética de seqüências de nucleotídeos (<i>gag</i>) de amostras brasileiras de LVPR de caprinos e ovinos	53
Figura 6-	Alinhamento de dedução de seqüências de aminoácidos de SRLV da região do gene <i>gag</i> (MA/CA) (947 nt).	56
Capítulo 3		
Figura 1	Antígenos recombinantes SGS e SS.....	67
Figura 2	Reatividade em ELISA SSB1* e SS0016** de soros de caprinos oriundos das regiões NE, SE e SU do Brasil	70

LISTA DE ABREVIACOES

BA – Bahia
BR - Brasil
BVD – Diarréia viral bovina
CA – Capsídio
CAEV – Artrite encefalite caprina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilnodiamino tetracético
ELISA - Ensaio imunoenzimático
IDGA - Imunodifusão em gel de Agar
IgG - Imunoglobulina G
HIV 1 - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
LBA - Lavado brônquio alveolar
LVPR - Lentivirus de pequenos ruminantes
M.O. I - Multiplicidade de infecção
MA - Maranhão
MA - Proteína da matriz
MEM - Meio essencial mínimo
MG - Minas Gerais
MHR - Região de homologia principal
MVV - Vírus Maedi- Visna
NaCl - Cloreto de sódio
NE - Nordeste
DO - Densidade óptica
Kpb, pb – kilopares de base, pares de base
PBL - Leucócitos do sangue periférico
PBMC - Células monoculares do sangue periférico
PBS - Solução salina de fosfato
PC - Plexo coróide
PE - Pernambuco
P.I. - Pós-inoculação
PI - Piauí
PO4 - Fosfato
RJ - Rio de Janeiro
RN - Rio Grande do Norte
RS - Rio Grande do Sul
SE - Sudeste
SFB - Soro fetal bovino
SP - São Paulo
STV - Solução de tripsina Versene
S – Sul
SU – Glicoproteína de superfície
TM - Proteína transmembrana

RESUMO

Com o objetivo de isolar e caracterizar por análise filogenética e antigênica os lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR), amostras de Plexo coróide, MSC, PBMC e LBA de 44 caprinos e soros de 1882 caprinos e de 67 ovinos e soros de caprinos (n=1882) e de ovinos (n=67) oriundos das regiões NE, SE e S do Brasil foram coletados entre 2009 a 2011. Trinta e dois DNA proviral de isolados de LVPR e de sangue (caprinos=6 e ovinos=2) foram amplificados por nested – PCR em dois fragmentos do gene *env* compreendendo a região V1V2 (394p) e V4V5 (608pb) e a região da matriz e capsídio do gene *gag* (990pb), seguido de sequenciamento de nucleotídeos. A resposta antigênica dos soros foi avaliada frente aos antígenos recombinantes multiepítotos com domínios imunodominantes das proteínas estruturais (MA, CA e SU baseado nos subtipos B1 e A13). LVPR foram isolados de 42 caprinos e não houve associação entre isolamento de LVPR e os achados clínicos, idade e nem tipo de raça ou produção. A caracterização genética e antigênica dos LVPR evidenciou, principalmente, a presença do subtipo B1 nos rebanhos caprinos, apesar de também ter sido encontrado em rebanhos de ovinos. Adicionalmente, encontrou-se o genótipo A em isolados de caprinos. A classificação de LVPR de ovinos no genótipo B e de caprinos no grupo A evidenciou a transmissão de MVV e CAEV interespecie entre caprinos e ovinos no Brasil. Análise de aminoácidos (V4/V5) identificou recombinação ou coinfeção ocorrendo em caprinos, dentre os quais, dois discordantes vírus agruparam nos grupos A e B, demonstrando que estes caprinos foram dualmente infectados, enquanto outro vírus apresentou uma inserção de novo motivo na região imunogênica da proteína de superfície (domínio V4). Estes resultados demonstram a diversidade genética e antigênica de estirpes de LVPR circulantes no Brasil e confirma a necessidade de considerar todos os genótipos virais em antígenos utilizados em testes sorológicos, a fim de evitar diagnósticos incorretos e aumentar a acurácia dos mesmos nos programas de controles de LVPR.

Palavras chaves: Caracterização genética e antigênica, isolamento, lentivirus de pequenos ruminantes, ovino, caprino, Brasil

ABSTRACT

With the goal to isolate and characterize by phylogenetic and antigenic analysis the small ruminant lentiviruses (SRLV), choroid plexus; MSC, PBMC and BAL samples from 44 goats and 1882 goat and 67 sheep serums from Northeast, Southeast and South of the Brazil were collected between 2009 at 2011. Proviral DNA from 32 SRLV isolates and from blood (6 goats and 2 sheep) were amplified by nested – PCR PCR in two fragments spanning either the V1V2 (394pb) or V4V5 (608pb) of *env* region, and one *gag* fragment (990pb) containing partial MA and entire CA coding sequence, followed by nucleotide sequencing. The antigenic response of sera were evaluated against multiepitope recombinant antigens with immunodominant domains of structural proteins (CA, MA, SU, based on the A13 and B1 subtypes). LVPR were isolated from 42 goats, and showed no association between LVPR isolation and clinical signs, age, breed or production type. LVPR genetic and antigenic characterization showed mainly the B1 subtype in dairy goats, despite having also been found in sheep. Additionally, the genotype A was found in goats. LVPR classification of sheep in B and goat in A-groups evidenced the MVV and CAEV interspecies transmission in Brazil. Amino acid analysis (V4/V5) identified coinfection or recombination occurring in goats, among which two discordant virus clusters corresponding to group A and B group, demonstrating that this goats was dually infected, while another virus showed a new motive inserted in the protein surface immunogenic region (V4 domain). These results demonstrated the genetic and antigenic diversity of Brazilian SRLV strains circulating in country, and confirm the necessity to consider all the viral genotypes in antigens used to serological tests, in order to prevent misdiagnosis and increase the accuracy of these in the SRLV controls programs

Keywords: Genetic and antigenic characterization, isolation, small ruminant lentivirus, sheep, goat, Brazil.

INTRODUÇÃO

Os Lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) compreendem as infecções pelos vírus Maedi Visna (MVV) e Artrite Encefalite Caprina (CAEV) que têm como hospedeiros os ovinos e caprinos. São doenças de grande distribuição geográfica, causando grandes perdas nas produções de ovinos e caprinos mundialmente.

No Brasil, essas espécies de ruminantes não são nativas e foram introduzidas no período colonial. Estes animais têm sua origem na Península Ibérica e mantiveram-se livres dessas doenças até a década de 1970, quando no intuito de melhorar geneticamente os rebanhos nacionais ocorreram grandes importações de animais de várias raças e origens sem os devidos controles sanitários. Assim, em 1986

animais positivos aos LVPR foram diagnosticados em rebanhos do Rio Grande do Sul, onde foi também realizado o primeiro isolamento viral em 1993. Após estes eventos, rebanhos de todas as regiões geográficas do Brasil foram diagnosticados para as doenças.

Diante dessa situação, é de fundamental importância o conhecimento dos vírus circulantes nos rebanhos nacionais e sua caracterização filogenética.

Para isso, a proposta dessa pesquisa, foi isolar vírus (LVPR), nas regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, e realizar o estudo filogenético dos isolados e caracterização antigênica para identificar quais os vírus circulantes e suas possíveis origens, auxiliando a melhoria dos métodos de diagnóstico e controle dessas doenças.

CAPÍTULO 1

Isolamento de amostras brasileiras de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR)

RESUMO

Lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) foram isolados de 42 caprinos oriundos de 34 propriedades localizadas nas regiões Sudeste (RJ, SP e MG) e Nordeste (RN, CE, BA, PE, BA, PI e MA) do Brasil. Diferentes espécimes para obtenção do isolamento viral foram comparados: cultivo primário de membrana sinovial caprina (MSC), plexo coróide (PC) e macrófagos (cocultivo de leucócito e lavado brônquio alveolar). A MSC ofereceu melhores condições e rendimento de cultivo para isolamento viral. O isolamento de LVPR foi confirmado por amplificação de uma região do gene *gag* do vírus a partir do DNA - proviral em uma *nested*-PCR. Não houve associação entre isolamento de LVPR e achados clínicos, idade e nem tipo de raça e tipo de produção.

Palavras chaves: Isolamento, LVPR, caprino, Brasil, *nested*-PCR, MSC.

1. INTRODUÇÃO

Infecções causadas por Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) compreendem aquelas causadas pelos vírus Maedi Visna (MVV) e artrite encefalite caprina (CAEV), inicialmente isolados em ovinos e caprinos, respectivamente. Os LVPR são distribuídos amplamente em todo mundo, causando infecção persistente em seus hospedeiros e são particularmente prevalentes entre as raças de caprinos leiteiros (Adams *et al.*, 1984). Todos os animais infectados por LVPR tornam-se transmissores potenciais do vírus, embora muitos deles sejam portadores assintomáticos.

As infecções pelos LVPR resultam em quatro síndromes crônicas de doença incluindo encefalomielite, artrite, pneumonia

intersticial e mastite (Cork *et al.*, 1974b; Crawford *et al.*, 1980; Phelps e Smith, 1993). Os LVPR infectam monócitos e macrófagos, onde se replicam e integram seu DNA intermediário (provirus) ao genoma dos hospedeiros, estabelecendo uma infecção persistente (Narayan *et al.*, 1983; Narayan e Cork, 1985; Phelps e Smith, 1993). Outros tipos celulares, como células epiteliais de diferentes órgãos, fibroblastos, células endoteliais, e células dendríticas, também são infectados e desempenham diferentes papéis na manutenção e propagação do vírus dentro do organismo e entre indivíduos (Gendelman *et al.*, 1985; Narayan e Clements, 1989; Zink *et al.*, 1990; Ryan *et al.*, 2000; Lamara *et al.*, 2001,2002; Adebayo *et al.*, 2010). É importante ressaltar que as células epiteliais da glândula mamária, bem como o colostro e o leite, contêm vírus livre, sendo uma importante via de transmissão para prole (Zink *et al.*, 1990; Ravazzolo *et al.*, 2006)

Desde a descoberta dos LVPR, a membrana sinovial caprina (MSC) e o plexo coróide (PC) foram os tecidos de escolha para o isolamento e identificação do CAEV e MVV (Sigurdsson *et al.*, 1960; Crawford *et al.*, 1980). O CAEV foi demonstrado em diferentes tecidos nervosos (plexo coróide, células microglial, astrócitos, oligodentrócitos, epitélio endodimial) (Sanna *et al.*, 1999), com uma replicação restrita em células de plexo coróide ovino (Chebloune *et al.*, 1996; Barros *et al.*, 2005), o que foi correlacionada à clivagem proteolítica anormal da glicoproteína do envelope viral (Chebloune *et al.*, 1996).

No Brasil foi realizado no Rio Grande do Sul, por cocultivo de leucócitos, o primeiro isolamento do CAEV (Hotzel *et al.*, 1993) e MVV (Moojen *et al.*, 1996). Isolamentos subsequentes foram realizados

principalmente a partir de cocultivo de leucócitos e cultivo primário de MSC (Castro *et al.*, 1999a; Lima *et al.*, 2004; Tigre *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2007; Feitosa *et al.*, 2011). Atualmente, a doença acomete os pequenos ruminantes em várias partes do Brasil acarretando grandes perdas econômicas (Leite *et al.*, 2004; Bohland e D'Angelino, 2005; Bandeira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Um estudo de isolamento para posterior caracterização de LVPR circulantes em diferentes regiões geográficas do Brasil, dentre as principais regiões produtoras de caprinos (Nordeste e Sudeste), seria importante para compreender a real importância desses vírus para a caprinocultura brasileira.

Nesse trabalho, propôs-se o isolamento de LVPR de caprinos oriundos das regiões sudeste e nordeste do Brasil e compararam-se diferentes tecidos para o isolamento viral. Além de estudar as características dos cultivos e/ou possíveis associações do isolamento viral com achados clínicos, raciais, tipo de produção e idade dos hospedeiros, também se objetivou estabelecer um banco de estirpes brasileiras de LVPR para estudos futuros.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e espécimes para o isolamento viral

As amostras foram coletadas durante os anos de 2009 a 2011 (Tabela 1) de 44 caprinos sorologicamente positivos para CAEV pelo teste de imunodifusão em Agar gel (Kit IDGA-CAE, Biovetech, Recife-PE, Brasil) provenientes de 34 propriedades comerciais nas regiões Sudeste (RJ, SP e MG) e Nordeste (RN, CE, BA, PE, BA, PI, e MA) do Brasil. Os animais tinham idade entre um a 12 anos e eram das raças Anglo nubiano (n = 10), Boer (n = 1), British alpina (n = 1), Pardo alpina (n = 7), Saanen (n = 21) e Toggenburg (n = 4) (Tabela 2). Os grupos amostrais foram classificados segundo a

faixa etária dos animais (até 2 (< 2), 2 a 4 (4), e maior que 4 anos (> 4)) (Tabela 1).

Trinta e nove animais foram eutanasiados e necropsiados. Coletaram-se as articulações dos carpos direito e esquerdo, o encéfalo e o lavado brônquio alveolar (LBA), os quais foram acondicionados em gelo até o procedimento de cultivos para o posterior isolamento viral (Tabela 1). O sangue dos 39 caprinos e de outros cinco animais não necropsiados, foi coletado com anticoagulante (EDTA) por venopunção da veia jugular e mantido refrigerado (4°C) para posterior extração das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e isolamento dos LVPR por cocultivo de leucócitos. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG protocolo # 101/2010).

2.2 Coleta de dados

Os animais foram examinados clinicamente quanto à presença de artrite, mastite ou sinais respiratórios. O exame clínico foi baseado na avaliação geral do estado de marcha, inspeção e palpação das articulações e da glândula mamária. Sinais clínicos relacionados aos LVPR foram observados como forma articular (aumento articular, claudicação), forma respiratória (tosse, secreção nasal) e forma mamária (endurecimento glandular, nodulações, hipertrofia de linfonodos retro-mamário e assimetria de tetos). Foram também categorizados em: artrite, artrite-mamária, mamária e outros (artrite e/ou mamária mais respiratória) e sem sinais clínicos (ausentes). As formas clínicas e os dados coletados referentes ao tipo de exploração do rebanho, raça e sexo e idade, considerados prováveis fatores de risco, foram submetidos ao teste de associação com a frequência de isolamento viral.

2.3 Controles

Os controles positivos e negativos para cultivo viral e extração do DNA proviral foram: amostra padrão de LVPR 75-G63 clone (ATCC®: VR-905™) e células de membrana sinovial caprina (MSC) não infectadas (ver item 2.4), respectivamente.

2.4 Cultivo celular primário de MSC não infectado

As células de MSC foram obtidas a partir de explantes de MSC da articulação carpal de fetos caprinos oriundos de cabras com dois testes (IDGA) subsequentes negativos para LVPR. A membrana sinovial foi fragmentada em pequenos pedaços e transferida para garrafas de cultivo de 25cm² e cultivada em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 20% de SFB, 1% de anfotericina B (0,5 µg/mL) e 2% de penicilina e estreptomicina (solução estoque 200 UI/mL e 200 µg/mL, respectivamente), incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, por até 30 dias e depois congelada por processo lento contendo MEM, DMSO e 20% SFB e estocada em nitrogênio líquido. Para a identificação de LVPR e patógenos contaminantes (Diarréia Bovina Vírus - BVD e *Mycoplasma* spp) foi utilizada uma reação em cadeia de polimerase (PCR) com iniciadores específicos para cada caso. A PCR para LVPR foi realizada segundo Barlough *et al.* (1994), enquanto os diagnósticos de BVD e *Mycoplasma* spp. foram realizados no Lanagro -MG - MAPA (Oliveira, 2012).

2.5 Isolamento de LVPR

O isolamento do vírus da artrite encefalite caprina foi obtido a partir de cultivo primário de plexo coróide (PC) e MSC, cocultivo de lavado brônquio alveolar (LBA) de animais necropsiados e/ou cocultivo de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com MSC.

2.5.1 Isolamento viral de LVPR a partir de cultivo primário de plexo coróide e MSC

O cérebro e as articulações dos carpos sem os tecidos tegumentares foram imersos em solução fisiológica de NaCl 0,9% esterilizada contendo antibiótico (penicilina 200 UI/mL/estreptomicina 200 µg/mL) e 5 mg/L anfotericina B por no mínimo 30 min a 4°C. O PC (lavado antes com 2 mL de meio MEM) e a MSC foram transferidos para uma Placa de Petri esterilizada (INLAB) imersos em 0,5 mL de meio MEM com antibiótico e cortados em minúsculos fragmentos com bisturi n° 22. Em seguida, com um auxílio de uma seringa de insulina esterilizada (1 mL), foram transferidos para garrafas de cultivo de 25cm² e placas de 24 poços (Sarsted) (Figura 2). Após 30 min em estufa a 37°C, 5% CO₂, para adesão dos explantes na superfície da garrafa, foi adicionado lentamente meio MEM suplementado com 20% de SFB, 1% de anfotericina B (0,5 mg/mL) e 2% de penicilina e estreptomicina (solução estoque 200 UI/mL e 200 µg/mL, respectivamente), e incubadas a 37°C, 5% CO₂ em uma atmosfera umidificada. No décimo quarto dia de cultivo, os explantes foram transferidos para outra garrafa e monocamadas foram tripsinizadas e subcultivadas na proporção de 1:1 por até três meses. Em intervalos de sete a 14 dias, realizaram-se repiques e extração de DNA da suspensão celular para detecção do DNA proviral, além de fixação e coloração das placas com cristal violeta a 0,1% (cristal violeta 0,1% 10 min seguido de lavagem com água destilada), para verificação do efeito citopático (Anexo, Figura 5).

2.5.2 Isolamento viral a partir de cocultivo de PBMC e LBA

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por centrifugação de 20 mL do sangue com EDTA em gradiente de ficoll (Phicoll-paque®, GE Healthcare, UK). Inicialmente o sangue foi

centrifugado a 400 x g por 10 min a 4°C e a capa leucocitária retirada por pipetagem e diluída (1:2) em solução salina fosfato 1x (PBS) (0,01M PO₄, 0,15M NaCl, pH 7,2). Esta camada foi vertida lentamente sobre 2 mL de ficoll e centrifugada a 500 x g por 30 min. Após centrifugação o PBMC foi lavado duas vezes com PBS 1x, depois ressuscitado em 1 mL de meio MEM e transferido para garrafa de 25cm² e placas de 24 poços, para maturação dos monócitos em macrófagos e incubação por sete dias a 37°C e 5% CO₂.

O LBA foi coletado após introdução de cerca de 200 mL de solução salina esterilizada (0,9% NaCl) em cada lobo pulmonar com uma seringa (20 ou 60 mL) acoplada a um cateter uretral n.º 22 (IBRAS-CBO, São Paulo), depois transferido para um tubo de 50 mL esterilizado e mantido sobre refrigeração até o processamento (Anexo, Figura 4). O LBA foi filtrado em uma gaze esterilizada e adicionado 2% de penicilina-estreptomicina (200 UI/mL e 200 µg/mL, respectivamente) e 1% de anfotericina B (0,5 mg/mL), centrifugou-se a 300 x g por 15 min. O sedimento foi lavado duas vezes com PBS 1x e ressuscitado em 1 mL de meio MEM e transferido (50.000 cel/cm²) para garrafas de 25cm² e placas de 24 poços.

Após 24 horas mantidas em 37°C e 5% CO₂ as células não aderentes dos cultivos de leucócitos e do LBA foram removidas após duas lavagens com PBS 1x esterilizado. Após sete dias, procedeu-se ao cocultivo dos macrófagos com MSC não infectada, acrescentando 30.000 células/cm² de MSC e meio essencial mínimo (MEM–Sigma Aldrich Co., U.S.A), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich Co., U.S.A), 0,5% de anfotericina B (50µg) e 1% de penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 µg/mL) e cultivados a 37°C, 5% CO₂ em uma atmosfera umidificada. No décimo quarto dia de cultivo as monocamadas dos cocultivos

foram tripsinizadas e subcultivadas na proporção de 1:1. No período máximo de três meses, em intervalos de 7 a 14 dias realizaram-se repiques e extração de DNA da suspensão celular para detecção do DNA proviral, além de fixação e coloração das placas com 0,1%, de cristal violeta para verificar a formação de efeito citopático (Anexo, Figura 4).

2.6 Detecção de LVPR nos cultivos de tecidos.

2.6.1 Amplificação do gene *gag* do DNA proviral

A detecção de LVPR nos cultivos celulares foi feita usando uma nested-PCR duplex como descrito previamente por Barlough *et al.* (1994). O DNA foi purificado usando o QIAamp mini DNA kit[®] (Qiagen, Courtaboeuf, France) de acordo com as instruções do fabricante. Duas reações de amplificação (nested-PCR duplex) foram usadas para detectar o gene *gag* do LVPR. Na primeira amplificação usou-se os oligonucleotídeos externos (Quadro 1) GAG 1 - EX e GAG 2 - EX, correspondendo às bases 953 a 975 e de 1249 a 1226 (referência a CAEV cork), respectivamente (Quadro 1). Oligonucleotídeos internos foram usados na segunda amplificação, GAG 3 - IN e GAG 4 - IN, localizados na posição 997-1024 nt e 1181 a 1154 nt (referência à CAEV cork), respectivamente (Quadro 1). A integridade do DNA foi verificada pela amplificação do gene de β-actina (ES30, ES32, ES31 e ES33) usando iniciadores baseados em sequências humana (Ali Al Ahmad *et al.*, 2008) (Quadro 1).

Na primeira reação de amplificação foi usado até 500ng de DNA genômico (5 µL em 50µL em uma reação contendo 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1,25U TaqDNA polimerase GoTaq Flex (Promega, Madison-WI, USA), 10 µL de tampão de reação 5x e 15 pmoles de cada iniciador (GAG 1 - EX, GAG 2 - EX, ES30 e ES32).

As condições de ciclagem foram 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 s e 56°C por 30 s, com extensão final de 72°C por 10 min. A segunda reação de amplificação foi realizada com 2µL da primeira reação e os iniciadores internos (GAG 3 - IN, GAG 4 - IN, ES31 e ES33) sob as mesmas condições. Os fragmentos amplificados de 186 pb (gene *gag*) e 393 pb (β -actina) foram detectados em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Safe® (Life Technologies, USA) e marcador de tamanho molecular de 100 pb (Life Technologies, USA) (Figura 2). Controles negativo (água destilada) e positivos (MSC infectada com LVPR 75-G63 clonada (ATCC® VR-905™)) foram usados em cada reação ou gel.

2.6.2 Amplificação do DNA-proviral para sequenciamento

Os iniciadores para a amplificação do gene *env* (SU) foram descritos por Leroux *et al.* (1997) e do gene *gag* (CA) por Lima *et al.* (2004), ambos com as sequências equivalentes de CAEV Cork (Saltarelli *et al.*, 1990) (Quadro 1).

Para PCRs utilizadas no sequenciamento a reação de amplificação foi realizada usando até 0,5µg de DNA genômico (5 µL em 50µL em uma reação contendo 2,0 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1,0U TaqDNA polimerase GoTaq Flex (Promega, Madison-WI, USA), 20 pmoles de cada iniciador e 10µL de tampão de PCR 5x), para gene *gag* e *env* (5 µL em 50µL em uma reação contendo 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1,5U TaqDNA polimerase GoTaq Flex (Promega, Madison-WI, USA), 20 pmoles de cada iniciador e 10µL de tampão de PCR 5x). Cada amplificação de PCR *env* e *gag* consistiram de uma desnaturação inicial de 5 min a 95°C, 35 ciclos de amplificação e extensão final de 10min (*env*) ou 8 min (*gag*) a 72°C. Os ciclos de amplificação foram: *env* (95°C, 45°C e 72°C

por 45 min cada) e *gag* (94°C, 45°C e 72°C por 45 min cada).

2.7 Sequenciamento

Bandas específicas de 630 e 530 pb, correspondentes aos produtos de amplificação dos genes *gag* (n = 13) e *env* (n = 23), respectivamente, foram purificadas com Gel Extraction Kit columns (Qiagen, Mississauga, ON), e foram sequenciadas, sem serem clonadas, em ambas as direções (senso e anti-senso). A reação de sequenciamento foi realizada usando o Kit Big Dye v3.1 da Applied Biosystems em sequenciador 3130 (Life Technologies, USA). As sequências de nucleotídeos foram editadas usando o seqScape software v2.7 (Life Technologies, USA).

2.8 Análise das sequências

As sequências editadas foram analisadas e tiveram a identidade comparada com as sequências de referências CAEV cork utilizando-se o programa Blastn 2.2.28 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabelas 2 e 3).

2.9 Análise estatística

Os dados foram tratados em programa Excel. A estatística descritiva e a associação da frequência do isolamento viral com possíveis fatores de risco (formas clínicas do LVPR, tipo de exploração do rebanho, raça e sexo) foram avaliadas e analisadas com o teste exato de Fisher, considerando nível de significância $p < 0,05$ utilizando o programa Statistica versão 12. A estatística descritiva dos dados obtidos nos isolamentos dos tecidos de MSC, PC, cocultivo de leucócitos e LBA (períodos de dias máximos, mínimo e médio, mediana dos cultivos virais) foi computada considerando o intervalo de confiança para médias com margem de erro de 5%.

Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados na nested-PCR e sequenciamento

Iniciador	Sequência 5'-3'	Senso	Posição CAEV cork	Tamanho (bp)	Fonte
GAG 1- EX ^a	CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG	+	953 - 975		Barlough <i>et al.</i> , 1994
GAG 2- EX ^a	TCCTACCCCCATAATTTGATCCAC	-	1249 -1226	297	
GAG 3- IN ^a	GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG	+	997-1024		
GAG 4- IN ^a	ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC	-	1181-1154	186	
ES30 ^b	TCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAG	+			
ES32 ^b	CCAGGGGAAGGCTTGAAG AGT GCC	-			
ES31 ^b	CC CAGCCATGTACGTTGCTATCC	+		393	Ali Al Ahmad <i>et al.</i> , 2008
ES33 ^b	GCCTCAGGGCAGCGGAACCGCTCA	-			
GAG 1 ^c	GGAGGGAGAAGCTGGAA	+			Lima <i>et al.</i> , 2004
GAG 2 ^c	CACATC TCTACATGCTTGCA	-		630	
ENV 1 ^d	GATATGGTGGAAACATATGAC	+	7.313-7332		Leroux <i>et al.</i> , 1997
ENV 2 ^d	CCATATGTRTAAGCTC	-	7.842-7827	530	

Legenda: ^anested PCR-LVPR, ^bnested - PCR β- actina, ^{c,d}sequenciamento

3. RESULTADOS

3.1 Isolamento do Viral

3.1.1 Isolamento viral e características de cultivos

Dos 44 animais utilizados para o isolamento de LVPR, apenas em dois não foram isolados o LVPR (Figuras 1 e 2; Tabela 1 e 4). Dentre os animais com isolamento positivo, os espécimes de MSC, PC, leucócitos e LBA foram positivos em 76,1% (35/39), 58,7% (27/39), 54,3% (25/33) e 28,3% (13/24), respectivamente (Tabela 1 e 4, Figura 1). De acordo com o sequenciamento os isolados tiveram sequências de nucleotídeos de significante identidade (78 a 94%, *e-value* ≤10⁻⁵ com CAEV cork (Tabelas 2 e 3). Os isolados de LVPR ficaram disponíveis para estudos posteriores e foram armazenados no banco de estirpes brasileiras do INCT- Informação Genética - Sanitária da Pecuária Brasileira com sede na Escola de Veterinária da UFMG.

Os explantes de tecidos do cultivo primário de plexo coróide e MSC aderiram em sua maioria à superfície da garrafa de cultura celular e as células se multiplicaram formando uma monocamada após 13 dias do cultivo (Anexo, Figura 5 - B e F). Os explantes de tecido em suspensão, quando transferidos para outra garrafa seguiram o mesmo padrão. Os cultivos foram submetidos de duas a cinco passagens.

O efeito citopático (ECP) foi observado com no mínimo 15 dias de cultivo, dentre eles, formação de sincício, lise, inclusão citoplasmática, vacuolização, arredondamento e formato estrelar da célula (MSC) (Anexo, Figura 5 - C a I). O controle positivo (MSC infectada com a cepa padrão CAEV 75-G63) apresentou efeito citopático no quinto dia de cultivo celular. Não foram observados os ECP descritos acima no controle negativo.

Considerando a média em dias de cultivo para o isolamento de LVPR entre os espécimes (plexo coróide, cocultivo de leucócitos, LBA e MSC), o período de 28 dias (23,2±33,2) e mediana de 23 dias

obtidos pelo cultivo da MSC foi o menor (Tabela 4, Figura 3). Treze dias foi período mínimo de cultivo, o qual foi observado no isolamento viral a partir de duas amostras de MSC e uma de PC, enquanto que, 70 dias foi período máximo de cultivo para isolamento viral, obtido em um espécime de MSC (Tabela 4, Figura 3). O animal 30M-RJ/10 apresentou os períodos mínimos de dias para o isolamento viral em todos os espécimes (MSC = 13, PC = 19, leucócitos e LBA = 17 dias).

Considerado o tipo de espécime cultivado para o isolamento de LVPR, não houve diferença significativa quando comparado os resultados de isolamento viral a partir de cocultivo de leucócito com MSC ($p=0,396$), plexo coróide ($p=0,648$) e LBA ($p=0,768$) ou plexo coróide com MSC ($p=0,379$).

Em relação ao processo relacionado ao pós-cultivo, os cultivos primários, especialmente, o cultivo de MSC, apresentaram manipulação mais prática e de rápida obtenção do isolamento viral, considerando o crescimento ótimo e contínuo dos explantes, formação da monocamada, manutenção dos cultivos e aparecimento do ECP. Em contraste, os cocultivos de leucócitos ($n=11$) e LBA ($n=10$) apresentaram fatores que levaram ao insucesso do isolamento viral, dentre os quais, destaca-se a contaminação do cultivo

e concentração celular insuficiente. Em algumas culturas de leucócitos o acúmulo de fibrina foi observado após 24 horas de cultivo. Enquanto que em alguns cultivos de LBA foram observados na monocamada outros tipos celulares além de macrófagos.

3.1.2 Associação da frequência de isolamento viral com possíveis fatores de risco.

Dados referentes ao tipo de exploração do rebanho, raça, sexo e forma clínica da doença foram coletados e analisados para verificar a existência de alguma associação destas variáveis com o isolamento de LVPR. As variáveis raças, forma clínica, sexo, tipo de exploração e idade não apresentaram associação estatística com a frequência de isolamento viral (Tabelas 5 a 7).

Considerando a variável sexo e raça, obtiveram maiores frequências de isolamento viral os animais da raça saanen (45%) e aqueles de faixa etária de dois a quatro anos (Tabelas 5 e 6). As frequências do isolamento viral de acordo com o tipo de exploração foram: 76,2% leite (32/42), 2,4% carne (1/42), 21,4% (9/42) com $p=0,635$. Dentre os sinais clínicos relacionados aos LVPR, os quais incluem as formas artrite, mamária e respiratória, a forma clínica artrite obteve a maior frequência de isolamento viral em todos os tecidos utilizados para o isolamento (Tabela 7).

Tabela 1. Caprinos utilizados para o isolamento viral de LVPR

Ident.								Sinal	Tipo	Isolamento	Tecidos isolados			
Animal	Raça	Sexo	Idade	Rebanho	Região	Estado	Cidade	Clínico	Exploração	Resultado	MSC	PC	LEUC	LBA
01A-PE/09	Pardo alpino	F	4	1	NE	PE	Garanhus	S/S	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	NR
02B-PE/09	Pardo Alpino	F	<2	2	NE	PE	Recife	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	NR
3C -RN/09	Saanen	F	4	3	NE	RN	Cruzeta	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	NR
4C-RN/09	Boer	F	>4	3	NE	RN	Cruzeta	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	NR
5C-RN/09	Toggenburg	F	>4	3	NE	RN	Cruzeta	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	NR
6C-RN/9	Toggenburg	F	4	3	NE	RN	Cruzeta	S/S	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR
8C-RN/10	A. nubiano	F	4	3	NE	RN	Cruzeta	LocMam	Mista	Negativo	NR	NR	Negativo	NR
9C-RN/10	Saanen	F	4	3	NE	RN	Cruzeta	Mam	Leite	Positivo	NR	NR	Positivo	NR
10D- MG/10	Saanen	F	4	4	SE	MG	Florestal	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR
12D-MG/10	Saanen	F	4	4	SE	MG	Florestal	LocMam	Leite	Positivo	NR	NR	Positivo	NR
14D-MG/10	Saanen	F	4	4	SE	MG	Florestal	Loc	Leite	Positivo	NR	NR	Positivo	NR
11D-MG/10	Saanen	F	>4	4	SE	MG	Florestal	Loc	Leite	Positivo	NR	NR	Positivo	NR
18E-MG/10	Toggenburg	F	>4	5	SE	MG	C. Pacheco	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
17E-MG/10	Toggenburg	F	4	5	SE	MG	C. Pacheco	S/S	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
19 F-MG/10	Saanen	F	>4	6	SE	MG	C. Pacheco	S/S	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	NR	Negativo
22G-MG/10	Saanen	F	>4	7	SE	MG	S. Gotargo	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
21G-MG/10	Saanen	F	4	7	SE	MG	S. Gotargo	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
23G-MG/10	Saanen	F	4	7	SE	MG	S. Gotargo	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
20G-MG/10	Saanen	F	<2	7	SE	MG	S. Gotargo	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
24H-PB/10	British alpina	F	>4	8	NE	PB	Soledade	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
25H-PB/10	A. nubiano	F	4	8	NE	PB	Soledade	S/S	Mista	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
27J- PB/10	Pardo alpino	F	4	9	NE	PB	Gurjão	Mam	Leite	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
26 I-PB/10	Saanen	F	4	9	NE	PB	Gurjão	LocMam	Leite	Positivo	Negativo	Positivo	NR	NR
28L-RJ/10	Saanen	F	4	10	SE	RJ	N. Friburgo	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
29M-RJ/10	Saanen	F	>4	11	SE	RJ	N. Friburgo	Loc	Leite	Negativo	Negativo	Negativo	NR	Negativo

continua

continuação

Ident.	Animal	Raça	Sexo	Idade	Rebanho	Região	Estado	Cidade	Sinal	Tipo	Isolamento	Tecidos isolados			
									Clínico	Exploração	Resultado	MSC	PC	LEUC	LBA
30M-RJ/10	Saanen	M	4	11	SE	RJ	N. Friburgo	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
32N- RJ/10	Pardo alpino	M	>4	12	SE	RJ	Teresópolis	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	
31N-RJ/10	Saanen	F	4	12	SE	RJ	Teresópolis	S/S	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	
33O-SP/10	Pardo alpino	F	>4	13	SE	SP	Botucatu	Out	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	NR	
37P-SP/10	Saanen	F	>4	14	SE	SP	São Pedro	LocMam	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Positivo	
38P-SP/10	Saanen	F	>4	14	SE	SP	São Pedro	Loc	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	Positivo	
39Q - PI/11	A. nubiano	F	<2	16	NE	PI	Tab.do Pau	Loc	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR	
40R-MA/11	A. nubiano	F	4	17	NE	MA	Timon	Out	Mista	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	
41S-Ma/11	A. nubiano	F	4	18	NE	MA	S.J.Ribamar	LocMam	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR	
42T-MA/11	Boer	M	4	19	NE	MA	V. Grande	S/S	Corte	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	
43U- MA/11	A. nubiano	M	4	20	NE	MA	Iga. Grande	Loc	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR	
44W-CE/11	Saanen	F	>4	21	NE	CE	Sobral	Out	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
45W-CE/11	Pardo Alpino	M	>4	21	NE	CE	Sobral	Out	Leite	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	NR	
46V-PI/11	A. nubiano	F	<2	22	NE	PI	União	LocMam	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
47V-PI/11	A. nubiano	F	<2	22	NE	PI	União	Loc	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	
48Y-CE/11	A. nubiano	F	4	23	NE	CE	Sobral	S/S	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	
49K-BA/11	P. alpino	F	>4	24	NE	BA	F. Santana	Out	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	NR	
50X-BA/11	A. nubiano	F	2	25	NE	BA	Ipirá	Loc	Mista	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	
51Z-BA/11	Saanen	F	4	26	NE	BA	S. A. Jesus	Mam	Leite	Positivo	Positivo	Positivo	NR	NR	

Descrição de origem (região, estado, cidade, rebanho), raça, sexo, sinais clínicos, sistema de exploração, resultado de isolamento e os diferentes tecidos cultivados. Quarenta e quatro caprinos oriundos dos estados de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Bahia (BA), Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte, Ceará (CE), Paraíba (PB), Maranhão (MA), Piauí (PI). Os dois animais em negritos foram negativos. A identificação do animal informa a propriedade (letra alfabética), estado brasileiro e ano que foi coletado. MSC, membrana sinovial caprina; LBA, lavado brônquio-alveolar; PC, Plexo coróide; Leuc, cocultivo de leucócitos; F, fêmea; M, Macho; NE, nordeste; SE, Sudeste; NR, não realizado. Faixa etária dos animais: até 2 (< 2), 2 a 4 (4), e maior que 4 anos (> 4). Sinais clínicos: Loc, artrite; Loc-mam, artrite-mamária; mam, mamária; outros (artrite e/ou mamária mais respiratória); S/S, sem sinais clínicos.

Tabela 2. Identidade das sequências de nucleotídeos do gene *gag* (412 nt) de isolados brasileiros de LVPR com CAEV cork (nBlast, Genbank).

	Isolado	Query cover	E value	Max ident
1	17E.MG.10.MSC	100%	0.0	94%
2	17E.MG.10.PC	100%	0.0	94%
3	40R.MA.11.LBA	100%	3e-178	93%
4	49K.BA.11.PC	100%	8e-160	91%
5	49K.BA.11.MSC.D	100%	8e-160	91%
6	18E.MG.10.PC.1	100%	0.0	94%
7	43U.MA.11.PC	100%	8e-160	91%
8	10D.MG.10.Leuc	100%	2e-176	93%
9	49K.BA.11.MSC.E	100%	2e-176	93%
10	51Z.BA.11.MSC.E	100%	8e-165	91%
11	51Z.BA.11.PC	100%	8e-165	91%
12	18E.MG.10.MSC	100%	0.0	94%
13	05C.RN.09.MSC	100%	0.0	94%

Tabela 3. Identidade das sequências de nucleotídeos do gene *env* (379 nt) de isolados brasileiros com CAEV cork (nBlast, Genbank).

	Isolado	Query cover	E value	Max Ident
1	30M.RJ.10.Leuc.1	99%	1e-106	84%
2	43U.MA.11.PC.1	99%	4e-97	83%
3	43U.MA.11.PC.2	99%	2e-95	83%
4	43U.MA.11.MSC.1	99%	9e-94	82%
5	41S.MA.11.Leuc.1	97%	4e-107	85%
6	44W.CE.11.MSC.1	99%	2e-95	83%
7	44W.CE.11.MSC.2	99%	9e-94	82%
8	11D.MG.10.Leuc.1	99%	3e-94	83%
9	10D.MG.10.Leuc.1	99%	1e-112	85%
10	17E.MG.10.PC.1	97%	4e-117	86%
11	18E.MG.10.MSC.1	99%	3e-113	85%
12	10D.MG.10.MSC.1	99%	1e-117	86%
13	10D.MG.10.MSC.2	99%	1e-107	85%
14	23G.MG.10.Leuc.1	98%	1e-62	78%
15	28L.MG.10.MSC.D.1	99%	9e-119	86%
16	19F.MG.10.MSC.1	100%	1e-106	84%
17	02B.PE.11.MSC.1	97%	2e-115	86%
18	01A.PE.10.Leuc.1	98%	1e-122	87%
19	28L.MG.10.MSC.E.1	99%	9e-119	86%
20	03C.RN.09.MSC.1	100%	1e-126	87%
21	24H.PB.10.MSC.1	100%	3e-128	88%
22	24H.PB.10.MSC.2	100%	7e-130	88%
23	05C.RN.09.MSC.1	98%	2e-124	87%

As sequências de nucleotídeos dos isolados brasileiros apresentaram significante alinhamento com CAEV no nBlast, Genbank. $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ é significativo ($e=10$); Max ident = identidade; *query cover* = cobertura da consulta. Leu = leucócitos, PC= Plexo coróide, MSC D= membrana sinovial caprina direita, MSC E = membrana sinovial caprina esquerda. Identidade com CAEV cork: gene *gag* = 91 a 93% e gene *env* 78 a 88 %.



Figura 1. Isolados de LVPR de Caprinos (n = 42) e estados oriundos no Brasil. Quarenta e dois caprinos oriundos dos estados de Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Bahia (BA), Pernambuco (PE), Rio Grande do Norte, Ceará (CE), Paraíba (PB), Maranhão (MA), Piauí (PI).

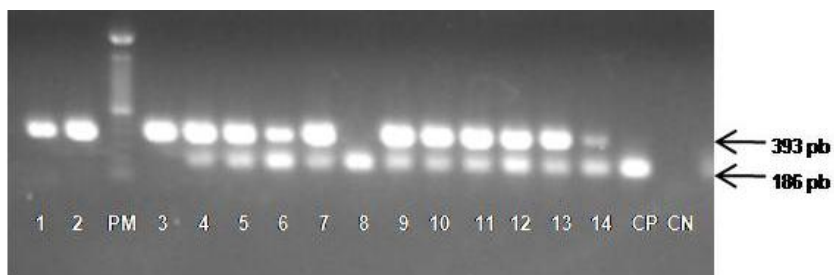


Figura 2. Eletroforese duplex - nested – PCR do CAEV. Amostras: 1, 2 e 3 são negativas; 4 a 14 são positivas. PM = peso molecular; CP = controle positivo; CN = controle negativo; pb= pares de base. Bandas: de 393 pb, β – actina; 186 pb, de CAEV.

Tabela 4. Estatística descritiva dos períodos em dias do isolamento de LVPR

Espécime	N	%	Média Dias	IC 95%	Mediana	Mínimo Dias	Máximo Dias	DP
MSC	35	76,1	28	23,6±33,2	23	13	70	13,91
PC	27	58,7	28,5	23,9±33,0	24	13	55	11,47
Co-Leucócitos	25	54,3	32,4	27,7±37,1	27	17	57	11,38
Co-LBA	13	28,3	28,4	22,4±34,3	24	17	49	9,85

Valores médio, mediana, mínimo e máximo em dias do período de cultivo para o isolamento de LVPR a partir de plexo coróide, leucócitos, LBA e MSC. Legenda: N= número, DP= desvio padrão, IC= intervalo de confiança.

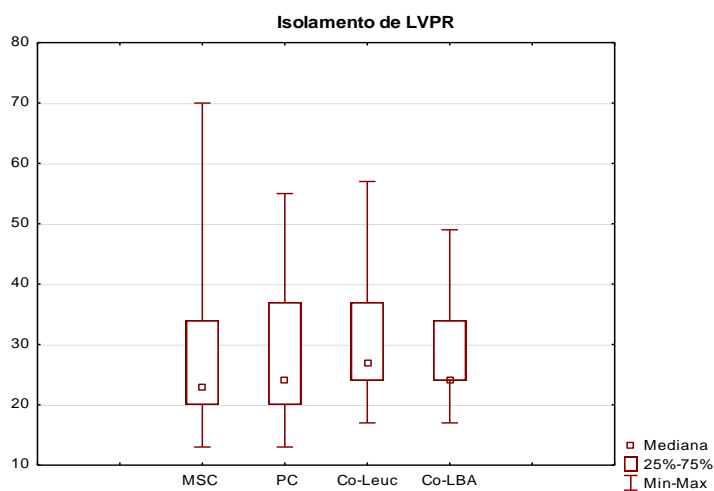


Figura 3. Box-plot do período (dias) do isolamento viral. Apresenta: mediana, os períodos máximos e mínimos em dias e percentagem de cada tecido cultivado. Legenda: Min, mínimo; Max, máximo; PC, Plexo coróide; MSC, Membrana sinovial caprina; co-Leuc, co-cultivo de leucócito; co-LBA, cocultivo de lavado brônquio alveolar. Limites confiança = 95%.

Tabela 5. Resultado da frequência de isolamento do LVPR a partir de caprinos oriundos de rebanhos brasileiros considerando a raça

Raça	Caprinos	Negativo	Positivo
A. nubiano	10	1	9
Boer	1	0	1
British alpina	1	0	1
Parda alpino	7	0	7
Saanen	21	1	20
Toggenburg	4	0	4
Total	44	2	42

Tabela 6. Resultado da frequência de isolamento do LVPR de diferentes tecidos isolados de caprinos oriundos de rebanhos brasileiros considerando idade do caprino.

Idade (anos)	Positivo			
	MSC n= 39 p=0.427	PC n= 39 p=0.195	LBA n= 24 p=0.593	Leuc n= 33 p=0.337
< 2	6	6	3	5
2 a 4	15 (42,8%)	11(40,7%)	5	13(52%)
>4	14	10	5	7
Total	37	27	13	25

Legenda: MSC (membrana sinovial caprina), LBA (lavado brônquio-alveolar), PC (Plexo coróide), Leuc (cocultivo de leucócitos).

Tabela 7. Resultado da frequência de isolamento do LVPR de diferentes tecidos isolados de caprinos oriundos de rebanhos brasileiros considerando sinais clínicos.

Sinais Clínicos	Positivos			
	MSC n= 39 p=0.380	PC n=39 p=0.456	LBA n=24 p=0.388	LEUC n=33 p=0.265
Artrite	13 (37,1%)	11 (40,7%)	6 (46,1%)	12 (44%)
Art-Mam	9	7	3	4
Mam	1	2	0	2
Outros	5	2	2	3
Ausente	7	5	2	4
Total	35	27	13	25

Legenda: MSC, membrana sinovial caprina; LBA, lavado brônquio-alveolar; PC, Plexo coróide; Leuc, cocultivo de leucócitos; art-mam, forma artrite e mamária. p <0.05

4. DISCUSSÃO

LVPR foi isolado de 42 caprinos, oriundos de rebanhos brasileiros, por explantação de plexo coróide e membrana sinovial caprina e cocultivo de leucócitos e LBA. O período médio, mínimo e máximo de cultivo para isolamento viral entre os tipos de cultivos foram relativamente próximos.

Com objetivo de avaliar as características de isolamento de LVPR, este trabalho utilizou quatro diferentes espécimes biológicos oriundos das linhagens monocítica-fagocitária (LBA e monócitos) e fibroblástica (plexo coróide caprino e MSC), obtendo maior sucesso de isolamento de LVPR em cultura primária de MSC (76,1%). Como a priori, sendo a artrite a síndrome mais característica de caprinos infectados com CAEV, as células derivadas de MSC foram usadas para cultivar este vírus (Crawford *et al.*, 1980; Narayan *et al.*, 1980), do mesmo modo que, o MVV foi cultivado em células de plexo coróide ovino, considerando as lesões inflamatórias envolvendo este tecido (Sigurdsson *et al.*, 1960).

A semelhança entre estes dois lentivirus, inclusive a sintomatologia nervosa (Sigurdsson *et al.*, 1957; Cork *et al.*, 1974a; Cork e Narayan, 1980; Sundquist, 1981), a constituição vascularizada do PC (Wolburg e Paulus, 2010), bem como, a replicação produtiva em PC observada em HIV-1 (Petito, 2004), levou este trabalho a realizar também o isolamento viral a partir do cultivo primário deste órgão (58,7%), o qual foi o segundo tecido com maior sucesso para o isolamento do LVPR. Embora tenha sido relatada uma replicação restrita do CAEV em células de PC ovino (Chebloune *et al.*, 1996; Barros *et al.*, 2005), no presente estudo o isolamento em PC caprino apresentou uma replicação produtiva do CAEV. E ambos os cultivos, de MSC e PC, apresentaram manipulação mais prática e de rápida obtenção do isolamento viral,

considerando o crescimento contínuo dos explantes, formação da monocamada, manutenção dos cultivos e aparecimento do ECP (Anexo, Figura 5).

Uma alta taxa de insucesso de isolamento foi observada nas culturas de cocultivos de leucócitos e LBA, o que pode estar associado à maior possibilidade de contaminação do cultivo ou concentração celular insuficiente, levando ao descarte da cultura. A menor recuperação de monócitos, provavelmente, pode estar associada a não adesão destas células a superfície da garrafa de cultivo, a baixa concentração de monócitos circulantes, ou ainda, a pequena taxa de maturação destes *in vitro* e de célula infectadas com vírus. De acordo com Narayan *et al.*, (1983) apenas uma quantidade mínima de monócitos (1:200) se maturam em macrófagos, dos quais cerca de 3% são infectados com o LVPR. Além disso, ocorreu formação de fibrina em alguns cultivos de leucócitos, provavelmente como consequência da coleta do plasma junto com o PBMC no gradiente de ficoll. A lavagem do PBMC com cloreto de amônia (CINH4 0.15M) com objetivo de evitar a formação de fibrina foi adotada por alguns autores (Castro *et al.*, 1999a; Tigre *et al.*, 2006). Em alguns cultivos de LBA foram observadas células fibroblásticas oriundas de fragmentos de pulmão, como relatado por Davies e Gordon (2005), as quais foram removidas pela filtração do LBA com gaze esterilizada.

O isolamento viral foi obtido entre 13 e 70 (média = 28) dias após a explantação dos tecidos ou cocultivos, com visualização de monocamada confluyente e ECP em 13 e 17 dias, respectivamente. Outros grupos obtiveram isolamento do LVPR entre 45 e 180 dias (Hotzel *et al.*, 1993; Castro *et al.*, 1999a; Test *et al.*, 1999; Lima *et al.*, 2004; Tigre *et al.*, 2006; Feitosa *et al.*, 2011). Em cocultivo de leucócitos foram observados sincício com seis meses após a cultura (Daltabuit Test *et al.*, 1999), enquanto que

no isolamento por explantação de MSC foi observado confluência em três semanas e ECP entre três (vacuolização e células sinciciais isoladas) e quatro semanas (sincícios multinucleados envolvendo a maioria da monocamada) (Crawford *et al.*, 1980). Em um estudo usando a técnica de digestão enzimática do tecido sinovial, em substituição à explantação, foi observada a formação de monocamada entre sete e 10 dias (Ratanapob e Rukkwamsuk, 2012).

No processo pré-cultivo, que envolveu desde a coleta dos espécimes até a sua cultura, todos os tecidos ofereceram particularidades e dificuldades que poderiam influenciar o sucesso do isolamento viral, dentre as quais podemos citar:

Plexo coróide:

- 1- Foi necessária muita habilidade para retirar o encéfalo íntegro, bem como atenção para não perder o PC durante sua retirada do crânio;
- 2- A lavagem do PC com meio de cultura para retirar o excesso de massa encefálica (excluindo a inclusão de outros tipos celulares);
- 3- Houve formação de algumas granulações sobre a monocamada, que desapareceram após algumas passagens do cultivo.

MSC:

- 1- A MSC foi coletada por escarificação utilizando o bisturi (evitou a inclusão de tecido conjuntivo fibroso e cartilaginoso no cultivo);
- 2- As articulações foram coletadas com a pele (evitando contaminação) e com distância de cerca de 8 cm dos ossos da tíbia e do rádio (facilitando a manipulação).

Leucócitos:

- 1- Algumas garrafas formaram uma camada de fibrina sobre a superfície celular,

- 2- Coágulos ou coagulação do sangue (dificultando ou inviabilizando a separação do PBMC).

LBA:

- 1- Grumos de células que não aderiram à superfície da garrafa de cultivo celular (LBA foi filtrado com uma gaze antes da centrifugação para reduzir o muco e excluir fragmentos de tecidos pulmonares);
- 2- Contato do LBA com conteúdo traqueal (introduzido o cateter por uma incisão na traquéia, próxima aos lóbulos pulmonares) (Anexo, Figura 4);
- 3- Pouco volume de LBA recuperado (infundido mais solução fisiológica nos lóbulos pulmonares para aumentar o volume de LBA recuperado e obter maior concentração celular).

Desde que excluam alguns fatores de insucesso para a obtenção do isolamento (concentração celular insuficiente, risco de contaminação e presença de fibrina) e que disponha de células negativas para o cocultivo (ex.: MSC, PC ou córnea caprina), o cocultivo de leucócito pode ser a técnica de escolha para isolamento de LVPR, quando houver a indisponibilidade de abate do animal, considerando a facilidade de obtenção do sangue.

O isolamento do LVPR não foi influenciado pela raça do animal, tipo de exploração do rebanho, idade do animal ou sinal clínico. Apesar da raça saanen (45%) e o tipo de exploração leiteira (71,7%) representar a maior frequência obtida de isolamento do LVPR, não foram observadas associações com esses fatores, os quais têm sido relacionados à soropositividade de infecção para o LVPR (Adams *et al.*, 1984; Karesh *et al.*, 2007).

Caprinos com idade de dois a quatro anos apresentaram as maiores frequências de

isolamento em todos os tipos de tecidos isolados. Entretanto, a associação entre o isolamento viral e a faixa etária dos animais não foi estatisticamente significativo. A idade do animal (animais mais velhos) tem sido associada à cronicidade da infecção por LVPR, entretanto, Crawford et al. (1980b) não encontraram esta relação, pois os caprinos entre dois e quatro anos apresentavam mais lesões articulares.

Maior frequência de isolamento viral foi observada nos animais que apresentaram a como forma clínica. Há relatos de correlação positiva entre cronicidade da lesão com o sucesso do isolamento viral (Adams et al., 1980) ou com altos títulos virais (Ravazzolo et al., 2006). Nos animais deste estudo, artrite foi clinicamente evidente, apresentando sinais clínicos como: rigidez em marcha, claudicação, inchaço das articulações e bursas (em particular na área do carpo), sensibilidade ao toque e atitudes e aprumos anormais.

Este estudo possibilitou o isolamento de LVPR de caprinos de diferentes regiões brasileiras e disponibilização dessas estirpes para estudos moleculares, genéticos e antigênicos posteriores, dentre outros. Adicionalmente, observou-se que o sucesso do isolamento viral não é influenciado por fatores clínicos, raciais, tipo de produção ou idade.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, foram obtidos isolados de LVPR de 42 caprinos oriundos da região Sudeste e Nordeste do Brasil.

O isolamento de LVPR pode ser obtido a partir dos cultivos de MSC, plexo coróide, cocultivo de leucócito e LBA, embora a MSC tenha apresentado melhores condições para o isolamento de LVPR (maior frequência de positividade e obtenção do isolamento viral com menor média de dias). A frequência do isolamento viral não é

influenciada por fatores de risco, tais como sinais clínicos de LVPR, tipo de exploração do rebanho, raça e sexo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B.; KLEVJER-ANDERSON, P. A pathogenetic study of the early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. *The American Journal of Pathology*, v. 99, n. 2, p. 257-278, 1980.

ADAMS, D. S.; OLIVER, R. E.; AMEGHINO, E. et al. Global survey of serological evidence of caprine arthritis-encephalitis virus infection. *The Veterinary Record*, v. 115, n. 19, p. 493-495, 1984.

ADEBAYO, I. A.; OLALEYE, O. D.; AWONIYI, T. A. Affinity (tropism) of caprine arthritis encephalitis virus for brain cells. *African Journal of Medicine and Medical Sciences*, v. 39 Suppl, p. 89-93, 2010.

ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J. L. et al. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. *Theriogenology*, v. 69, n. 4, p. 473-480, 2008.

BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O. et al. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. *Veterinary Journal*, v. 180, n. 3, p. 399-401, 2009.

BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J. D. et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *Journal of Virological Methods*, v. 50, n. 1-3, p. 101-113, 1994.

BARROS, S. C.; ANDRESDOTTIR, V.; FEVEREIRO, M. Cellular specificity and replication rate of Maedi Visna virus in vitro can be controlled by LTR sequences. *Archives of Virology*, v. 150, n. 2, p. 201-213, 2005.

- BOHLAND, E.; D'ANGELINO, J. L. Artrite encefalite caprina: avaliação dos aspectos produtivos e reprodutivos de animais infectados e não infectados *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, n. 2, p. 81-88, 2005.
- CASTRO, R.; LEITE, R. C.; RESENDE, M. *et al.* Isolamento e identificação pela imunofluorescência direta e reação em cadeia de polimerase do vírus da artrite-encefalite caprina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51 n. 3, p. 235-240, 1999.
- CHEBLOUNE, Y.; SHEFFER, D.; KARR, B. M. *et al.* Restrictive type of replication of ovine/caprino lentiviruses in ovine fibroblast cell cultures. *Virology*, v. 222, n. 1, p. 21-30, 1996.
- CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B. *et al.* Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974a.
- CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; GORHAM, J. R. *et al.* Pathology of viral leukoencephalomyelitis of goats. *Acta Neuropathologica*, v. 29, n. 4, p. 281-292, 1974b.
- CORK, L. C.; NARAYAN, O. The pathogenesis of viral leukoencephalomyelitis-arthritis of goats. I. Persistent viral infection with progressive pathologic changes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, v. 42, n. 6, p. 596-602, 1980.
- COSTA, L. S. P.; LIMA, P. P.; CALLADO, A. K. C. *et al.* Lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos santa inês: Isolamento, identificação pela PCR e inquérito sorológico no estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, v. 74, n. 1, p. 11-16, 2007.
- CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; CHEEVERS, W. P. *et al.* Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. *Science*, v. 207, n. 4434, p. 997-999, 1980.
- DALTAUIT TEST, M.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; ESPINOSA, L. E. *et al.* Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, v. 63, n. 3, p. 212-215, 1999.
- DAVIES, J. Q.; GORDON, S. Isolation and Culture of Human Macrophages. In: HELGASON, C. D.; MILLER, C. L. (eds). *Methods in Molecular Biology: Basic Cell Culture Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2005. 290, Cap. 8, p. 371.
- FEITOSA, A. L. V. L.; TEIXEIRA, M. F. S.; PINHEIRO, R. R. *et al.* Primeiro isolamento de lentivírus de pequenos ruminantes em caprino naturalmente infectado em rebanho do Rio Grande do Norte, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico* v. 78., n. 4, p. 501-505, 2011.
- GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; MOLINEAUX, S. *et al.* Slow, persistent replication of lentiviruses: role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 82, n. 20, p. 7086-7090, 1985.
- HOTZEL, I.; BASTOS EDE, S.; RAVAZZOLO, A. P. *et al.* Caprine arthritis-encephalitis virus: isolation and identification in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 26, n. 11, p. 1175-1179, 1993.
- KARESH, W.; COOK, R.; GILBERT, M. *et al.* Implications of wildlife trade on the movement of avian influenza and other infectious diseases. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 43, n. Suppl 3, p. S55 - S59, 2007.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L. *et al.* Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. *Virus Research*, v. 79, n. 1-2, p. 165-172, 2001.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L. *et al.* Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Research*, v. 87, n. 1, p. 69-77, 2002.

- LEITE, B. L. S.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R. *et al.* Avaliação da taxa de ocorrência da artrite-encefalite caprina vírus pelas regionais do escritório de defesa agropecuária do estado de São Paulo, Brasil, e seu mapeamento por meio de sistema de informações geográficas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 1, p. 21-26, 2004.
- LEROUX, C.; CHASTANG, J.; GREENLAND, T. *et al.* Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of virology*, v. 142, n. 6, p. 1125-1137, 1997.
- LIMA, P. P.; ROCHA, M. A.; STANCEK, D. *et al.* Vírus da artrite encefalite caprina: isolamento e caracterização de parte do gene gag. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 2, p. 135-142, 2004.
- MOOJEN, V.; BARTH, O. M.; RAVAZZOLO, A. P. *et al.* Maedi-Visna Virus: first isolation and identification from naturally infected lamb in Brazil. In: CONGRESSO ARGENTINO DE VIROLOGIA, 1996, Tandil, Argentina Anais., 1996, p. 89.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. *The Journal of General Virology*, v. 70 (Pt 7), p. 1617-1639, 1989.
- NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D. *et al.* Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. *Journal of General Virology*, v. 50, n. 1, p. 69-79, 1980.
- NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia leukoencephalomyelitis and arthritis. *Reviews of Infectious Diseases*, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.
- NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D. *et al.* Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. *Infection and Immunity*, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.
- OLIVEIRA, T. F. P. Padronização e aplicação da PCR para detecção de contaminantes em cultivos celulares, soros e tripsinas. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- PETITO, C. K. Human immunodeficiency virus type 1 compartmentalization in the central nervous system. *Journal of Neurovirology*, v. 10 Suppl 1, p. 21-24, 2004.
- PHELPS, S. L.; SMITH, M. C. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 203, n. 12, p. 1663-1666, 1993.
- RATANAPOB, N.; RUKKWAMSUK, T. Culture and identification of goat synovial membrane cells for caprine arthritis encephalitis virus diagnosis. *Journal of Animal and Veterinary Advances* v. 11, n. 11, p. 1827-1830, 2012.
- RAVAZZOLO, A. P.; NENCI, C.; VOGT, H. R. *et al.* Viral load, organ distribution, histopathological lesions, and cytokine mRNA expression in goats infected with a molecular clone of the caprine arthritis encephalitis virus. *Virology*, v. 350, n. 1, p. 116-127, 2006.
- RYAN, S.; TILEY, L.; MCCONNELL, I. *et al.* Infection of dendritic cells by the Maedi-Visna lentivirus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 21, p. 10096-10103, 2000.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A. *et al.* Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v. 179, n. 1, p. 347-364, 1990.
- SANNA, E.; SANNA, M. P.; VITALI, C. G. *et al.* Proviral DNA in the brains of goats infected with caprine arthritis-encephalitis virus. *Journal of Comparative Pathology*, v. 121, n. 3, p. 271-276, 1999.
- SIGURDSSON, B.; PÁLSSON, P.; GRÍMSSON, H. Visna, A Demyelinating Transmissible Disease of Sheep. *Journal of*

Neuropathology & Experimental Neurology, v. 16, n. 3, p. 390-403, 1957.

SIGURDSSON, B.; THORMAR, H.; PÁLSSON, P. Cultivation of visna virus in tissue culture. *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, v. 10, n. 3, p. 368-381, 1960.

SILVA, J. G.; ARAÚJO, P. B.; SOUZA, W. M. A. *et al.* Soroprevalência de Lentivirus em caprinos leiteiros. *Medicina Veterinária, Recife*, v. 6, n. 3, p. 9-12, 2012.

SUNDQUIST, B. Goat visna virus: Isolation of a retrovirus related to visna virus of sheep. *Archives of virology*, v. 68, n. 2, p. 115-127, 1981.

TEST, M. D.; DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; ESPINOSA, L. E. L. *et al.* Isolation of caprine arthritis encephalitis virus from goats in Mexico. *Canadian journal of*

veterinary research-revue Canadienne de recherche veterinaire, v. 63, n. 3, p. 212-215, 1999.

TIGRE, D. M.; CAMPOS, G. S.; SARDI, S. I. Isolamento e identificação do vírus da Artrite encefalite caprina, a partir do co-cultivo de células mononucleares do sangue com células de membrana sinovial de cabra. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 5, n. 2, p. 124-131, 2006.

WOLBURG, H.; PAULUS, W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, v. 119, n. 1, p. 75-88, 2010.

ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. *The American Journal of Pathology*, v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.

ANEXOS

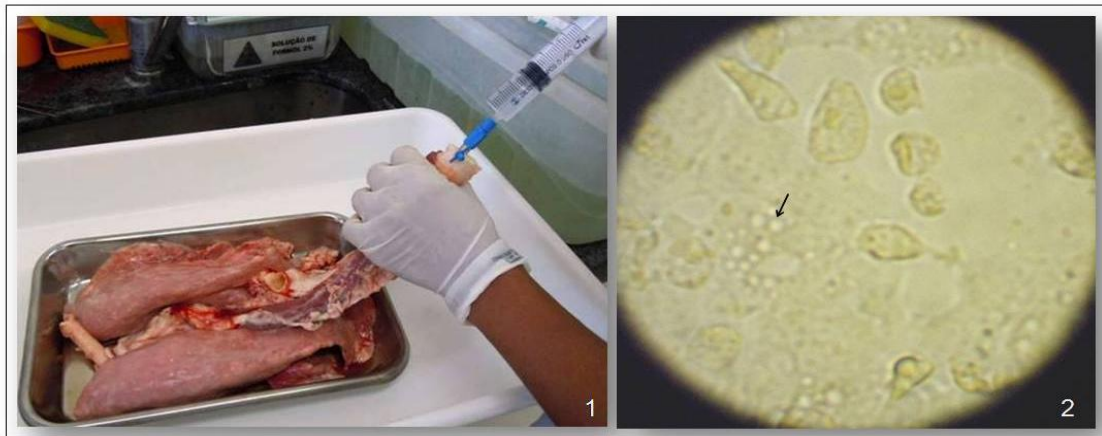


Figura 4. Cocultivo de Lavado brônquio alveolar. Coleta de lavado brônquio alveolar (LBA) com uma seringa acoplada ao cateter (1); cultivo de LBA apresentando macrófagos vacuolizados (seta) (2) - aumento 100X.

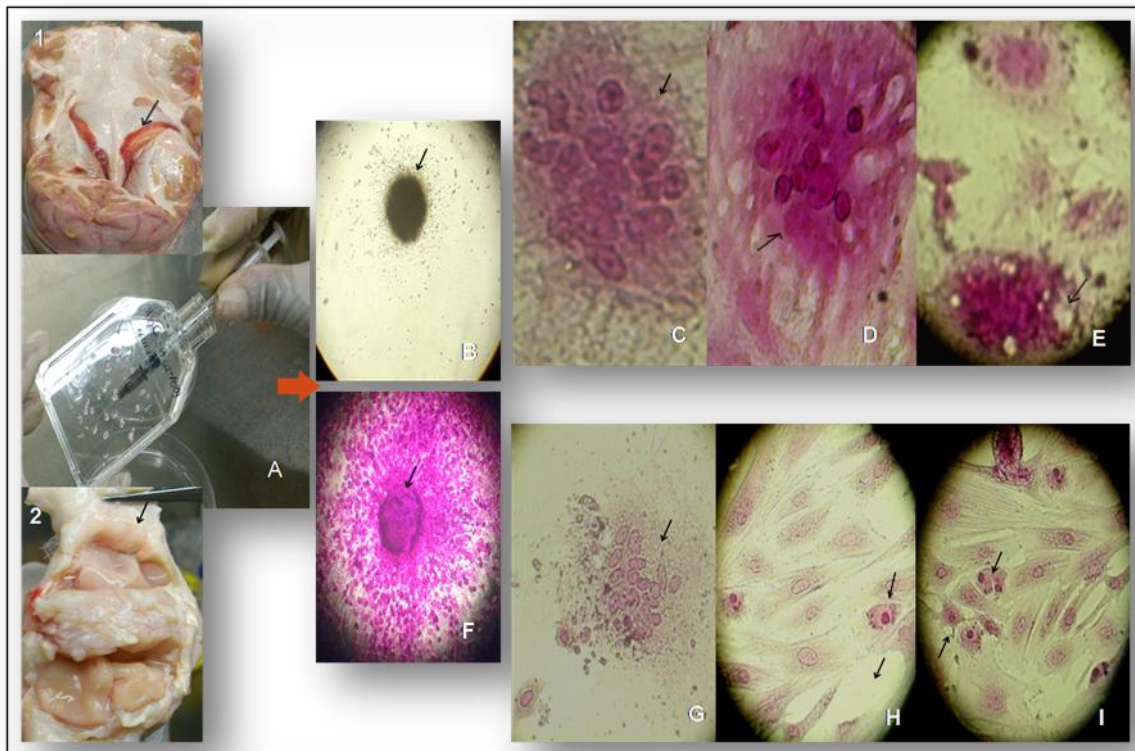


Figura 5. Cultivo primário de membrana sinovial caprina (MSC) e Plexo coróide (PC). Encéfalo (1) com o plexo coróide (seta); articulação do carpo e MSC (seta); introdução dos explantes com uma seringa de insulina na garrafa de cultivo celular (A); monocamada celular, explante aderido (seta) e migração celular do tecido de PC (B) e MSC (F); efeito citopático: sincício (C, D, E, G), vacuolização (E) e inclusão citoplasmática e lise celular (H e I), célula estrelar (I). Corado com cristal violeta 0,1%. Aumento 100x.

CAPÍTULO 2

Caracterização filogenética de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) em caprinos e ovinos naturalmente infectados em rebanhos brasileiros

RESUMO

Trinta e dois isolados de LVPR de caprinos e oito DNAs provirais de sangue de caprinos e ovinos oriundos da região sudeste e nordeste do Brasil foram caracterizados filogeneticamente baseado nos genes *gag* (MA/CA) e *env* (V1V2, V4/V5). A análise filogenética de isolados brasileiros de LVPR evidenciou, principalmente, a presença do subtipo B1 nos rebanhos caprinos. Houve também a identificação do genótipo A em caprinos, com alta divergência genética sugerindo a formação de dois novos subtipos. Dois ovinos foram identificados com subtipo B1 de LVPR pela primeira vez no Brasil. A classificação de LVPR de ovinos no subtipo B1 (grupo CAEV) e de caprinos no grupo A (MVV) evidenciou que a transmissão de CAEV e MVV interespecie de caprino e ovino tem ocorrido naturalmente no Brasil. A análise de aminoácidos da região V4/V5 identificou recombinação ou coinfeção ocorrendo em caprinos, dentre os quais, dois discordantes vírus (Br849 e Br195) agruparam nos grupos A e B, demonstrando que estes caprinos foram dualmente infectados, enquanto outro vírus (Br1163) apresentou uma inserção de novo motivo na principal região imunogênica da proteína de superfície (SU4).

1. INTRODUÇÃO

Lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) são grupos heterogêneos de retrovírus causando doença multisistêmica crônica em ovinos e caprinos. Os vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e Maedi-Visna (MVV), originalmente isolados em caprinos e ovinos, respectivamente, têm sido segregados dentro dos maiores genótipos de LVPR (A a E). Relatos recentes indicam que

a espécie-especificidade destes vírus não é restrita como previamente acreditava-se. Vírus MVV-like têm sido encontrados em caprinos, e alguns isolados de ovinos têm sido agrupados dentro dos genótipos de CAEV (Shah *et al.*, 2004a), confirmando a hipótese de que transmissão do vírus entre as diferentes espécies pode ocorrer em condições naturais (Shah *et al.*, 2004b; Pisoni *et al.*, 2006; Gjerset *et al.*, 2007). A coinfeção e a recombinação de ambos os vírus têm sido reportadas em caprinos e ovinos (Pisoni *et al.*, 2007; Olech *et al.*, 2012; Santry *et al.*, 2013).

LVPR são disseminados mundialmente, e as perdas econômicas resultantes impulsionaram o desenvolvimento de programas de erradicação baseados principalmente na segregação dos animais infectados em vários países (Valas *et al.*, 2011). A biologia molecular tem sido uma importante ferramenta para o estudo epidemiológico sobre a circulação viral, classificação e evolução genômica dos LVPR e outros vírus (Zanoni, 1998; Shah *et al.*, 2004a; Fevre *et al.*, 2006; Wan *et al.*, 2008; Giammarioli *et al.*, 2011).

Shah *et al.* (2004a), baseando-se na classificação do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), estruturaram a relação filogenética do LVPR baseando-se nos genes *pol* e *gag*, em grupos/genótipos e subtipos, aos quais novas descobertas têm sido agregadas. Atualmente, os LVPR classificam-se em cinco grupos principais, de A a E, que diferem de 25 a 37% na sequência de nucleotídeos (Shah *et al.*, 2004a; Grego *et al.*, 2007). MVV e CAEV, protótipos do grupo A e B, respectivamente, tem distribuição mundial, enquanto o grupo C e E são mais restritos geograficamente. O grupo A é bastante heterogêneo, uma vez

que contém 13 subtipos (A1 a A13), enquanto que o grupo B contém apenas três subtipos, B1 a B3. As estirpes virais isoladas da Noruega são classificadas dentro do grupo C e as estirpes virais isoladas na Suíça e Espanha são incluídas no grupo D. O grupo E foi detectado apenas na Itália e contém dois subtipos (E1 e E2) (Zanoni, 1998; Shah *et al.*, 2004a; Pisoni *et al.*, 2005; Pisoni *et al.*, 2006; Reina *et al.*, 2006; Grego *et al.*, 2007; Bertolotti *et al.*, 2011; Giammarioli *et al.*, 2011; Reina *et al.*, 2011). O genótipo ou grupo A é chamado de MVV e o grupo B de CAEV.

O genoma dos LVPR (9,2 Kpb) é similar a de outros lentivirus, constituído por genes codificadores das proteínas estruturais (*gag* e *env*) e enzimas virais (*pol*), acessórios (*tat*, *rev* e *vif*) com funções regulatórias na replicação viral, além de duas regiões terminais não codificantes (LTRs) (Saltarelli *et al.*, 1994; Blacklaws, 2012) (Figura 1). LVPR são caracterizados por um alto grau de variabilidade genética durante o processo de replicação, com consequências na diversidade e evolução lentiviral, resultando na formação de estirpes diferentes e quasispecies (Pasick, 1998; Zanoni, 1998). Estas variações ocorrem, principalmente, no gene *env*, enquanto *pol* e *gag* são regiões relativamente bem conservadas (Saltarelli *et al.*, 1994; Zanoni, 1998) (Figura 1). As proteínas estruturais dos genes *gag* (capsídio - CA e matriz - MA) e *env* (superfície-SU e transmembrana - TM) são os principais alvos da resposta imune humoral e têm sido selecionadas como antígenos para o sorodiagnóstico (Gogolewski *et al.*, 1985) (Figura 1). Entretanto, as variações antigênicas de estirpes dos LVPR podem interferir no diagnóstico e a identificação dos subtipos virais circulantes em cada país e sua relação antigênica com estirpes de referências é de fundamental importância para a acurácia do diagnóstico (Peterhans *et al.*, 2004; Herrmann-Hoesing, 2010).

Nestas proteínas estruturais tem sido identificado epitopos imunodominantes importantes para a resposta imune. A proteína SU (554 aminoácidos) é muito variável, com numerosos resíduos de cisteínas e altamente glicolizada (Saltarelli *et al.*, 1994). O perfil de variabilidade de SU é comparado ao HIV, com cinco regiões variáveis (V1 a V5) e quatro regiões conservadas (C1 a C4) (Valas *et al.*, 2000) (Figura 1). Cinco domínios imunogênicos foram identificados em SU, sendo os epitopos dentro da região C1 (SU1) e V5 (SU5) considerados imunodominantes (Bertoni *et al.*, 2000; Valas *et al.*, 2000), e um domínio neutralizante na região V4. Neste domínio da região V4, que é imunogênico e muito divergente, os vírus tipo maedi visna têm deleções de seis aminoácidos (Saltarelli *et al.*, 1990). Na proteína *gag* foram identificados quatro epitopos imunodominantes (Rosati *et al.*, 1999; Grego *et al.*, 2002; Rosati *et al.*, 2004; Lacerenza *et al.*, 2008), incluindo a região de homologia principal (MHR) presente na porção central do capsídio (aa153 a 172, HIV-1), que é muito conservada em todos os retrovírus, possuindo os resíduos invariáveis (Q₁₅₅, E₁₅₉ e K₁₆₇) e um resíduo aromático invariável (F₁₆₄) (Mammano *et al.*, 1994). A conservação de MHR tem importante função na replicação viral. Em alinhamentos do gene *gag*, MVV apresenta uma inserção de sete aminoácidos na porção c-terminal da proteína da matriz.

A identificação da diversidade genética dos LVPR nos rebanhos brasileiros, assim como, a avaliação da variabilidade nas principais regiões imunodominantes de SU (*env*) e MA/CA (*gag*) é importante para estabelecer a epidemiologia da circulação viral e melhorar o diagnóstico visando o controle dos LVPR no Brasil.

Os LVPR foram introduzidos no rebanho brasileiro, provavelmente a partir de 1976 com importação de raças geneticamente melhoradas, inicialmente para a região

sudeste, oriundas da Europa, principalmente Inglaterra, Suíça, Alemanha e França. Atualmente, a prevalência de CAEV chega até a 43%, acometendo rebanhos caprinos em várias partes do Brasil e causando prejuízos na caprino-ovino cultura local (Bohland e D'Angelino, 2005; Bandeira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Os poucos estudos de filogenia no Brasil, dentre os quais nos estados do CE, RS e MG (Castro *et al.*, 1999b; Ravazzolo *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2004; Feitosa *et al.*, 2010), têm identificado os genótipos A e B em ovinos e caprinos, respectivamente (Ravazzolo *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2004). Entretanto, relato feito por Castro *et al.* (1999b) do genótipo A ocorrendo em caprino naturalmente infectado, evidencia a possibilidade de transmissão interespecie nos rebanhos brasileiros.

Considerando a importância da caprino-ovino cultura e a hipótese que as LVPR são prevalentes nos rebanhos brasileiro com possibilidade de transmissão interespecie, o objetivo deste trabalho foi a caracterização filogenética dos LVPR isolados nas regiões nordeste e sudeste do Brasil, baseando-se em sequências dos genes *gag* (CA/MA) e *env* (SU) e avaliar a variabilidade das principais regiões imunodominantes destes genes nas estipes brasileiras de LVPR.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Trinta e dois isolados de LVPR de caprinos e oito DNAs provirais de sangue de caprinos e ovinos oriundos da região sudeste e nordeste do Brasil integraram este estudo. Vinte e cinco estirpes, dentre os 42 isolados de LVPR de caprinos obtidos durante 2009 a 2011, foram oriundos de 20 propriedades comerciais (MG (7); PB (1); RN (2); RJ (4); SP (1); MA (3); PI (2); CE (3); BA (2)). Além de seis DNAs provirais de sangue de caprinos (PB (1); MA (2), PI (1), RJ (1); BA (1)) e dois de ovinos (MA), positivos para

LVPR em teste de ELISA recombinante (Olech *et al.*, 2012), foram selecionados para o estudo de caracterização filogenética (Tabela 1). Sete isolados obtidos no ano de 1995 e oriundos de caprinos de duas propriedades dos estados de MG (6) e uma de PE (2), foram incluídos no estudo, alguns dos quais já relatados previamente (BrMg1 (01); BrMg1(02); BrMg2 (03), BrPe1 (01)) (Castro *et al.*, 1999b) (Tabela 1). Os animais tinham idade entre um a 12 anos, incluindo as raças: Anglo nubiano, Boer, British alpina, Pardo alpino, Saanen, Toggenburg.

O isolamento de LVPR foi obtido a partir do cultivo primário de plexo coróide (PC), MSC e cocultivo de leucócitos ou LBA (lavado brônquio alveolar). O sangue de caprinos e ovinos foi coletado em sistema a vácuo com anticoagulante (EDTA) por venopunção da veia jugular, e centrifugado a 400 x g por 10 min a 4°C e os leucócitos do sangue periférico (PBL) foram aspirados por pipetagem.

2.2 Extração de DNA proviral

O DNA-proviral da monocamada celular dos isolados de LVPR e leucócitos do sangue periférico (PBL) foram purificados usando o QIAamp min DNA kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) de acordo com as instruções do fabricante.

2.3 Amplificação do DNA proviral

2.3.1 Amplificação dos fragmentos dos genes *env* e *gag* pela PCR

Dois fragmentos compreendendo a região V1V2 (394pb) e V4V5 (608pb) do gene *env* foram amplificados por *nested*-PCR (Figura 1). A posição dos nucleotídeos refere-se ao clone CAEV-Cork (Genbank: acesso M33677) (Saltarelli *et al.*, 1990). Os iniciadores Pta1 e Penv foram desenhados pelo alinhamento de várias sequências de SRLV disponíveis no banco de genomas GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e usados na primeira PCR (Quadro 1). Os iniciadores A51/B31 e 567/564 foram utilizados na segunda reação para a amplificação dos fragmentos V1V2 e V4V5, respectivamente (Quadro 1) (Germain e Valas, 2006; Mordasini *et al.*, 2006). Onze isolados com sequenciamentos ineficientes em V4V5 foram amplificados com os iniciadores Env1 e Env2, que incluíam domínio V4 de SU (379 pb) (Leroux *et al.*, 1997) (Quadro 1). Um fragmento de 990 pb relativo ao gene *gag* incluindo a MA, exceto os 38 primeiros resíduos da porção N-terminal da proteína, mais a sequência completa de CA foi amplificado por *nested-PCR* usando os iniciadores GAGf1 e P15, na primeira reação, e MA3f e NC3r na segunda (Quadro 1).

O primeira reação de amplificação foi realizada usando 0,5µg de DNA genômico dentro de um volume final de 50µL contendo tampão de PCR 1X (Bio-Rad), 2 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 300 nM de cada iniciador e 1,25 U de Taq DNA polimerase (iTaQ, Bio-Rad). A segunda amplificação foi realizada com 5µL da primeira reação e os iniciadores internos. Cada amplificação de PCR consistiu de uma desnaturação inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de amplificação e extensão final de 10min a 72°C. Cada ciclo dos 35 ciclos amplificação do fragmento *env* incluiu desnaturação 30 s a 95°C, hibridação dos iniciadores 40 s a 56°C e extensão 90 s a 72°C na primeira reação, e respectivamente 30 s a 95°C, 40 s a 58°C e 50 s a 72°C na segunda reação. As condições de ciclagens

referentes à amplificação do fragmento *gag* foram respectivamente 30s a 95°C, 40 s a 55°C e 90 s a 72°C na primeira reação, e 30 s a 95°C, 40 s a 51°C e 60 s a 72°C na segunda. As PCRs foram realizadas em termociclador BioRad cyclor (Bio-Rad). Os fragmentos amplificados foram detectados em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídeo (Life Technologies, USA) e marcador de tamanho molecular de 100 pb.

2.4 Sequenciamento

As bandas específicas em gel de agarose provenientes das PCR com iniciadores *gag* e *env* amplificadas (Quadro 1) foram purificadas com QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Mississauga, ON) e foram sequenciadas, sem serem clonadas, e as sequências consenso foram usadas no alinhamento de nucleotídeos usando ClustalW versão 1.8 (Valiente Moro *et al.*, 2005

(Valiente Moro *et al.*, 2005)A reação de sequenciamento foi realizada em ambas as direções usando o ABI BigDye v3.1 reação. Rearranjos manuais do alinhamento, incluindo exclusão de gaps e ajuste do tamanho, foram aplicados para atingir resultados ótimos. Alinhamentos múltiplos das sequências de nucleotídeos e dedução de aminoácidos foram feitos com ClustalW em MEGA versão 5 e Bioedit versão 7.0, respectivamente. Comparação das distâncias genéticas foi calculada em software MEGA 5.0 com modelo de substituição p-distance (aminoácidos) e Kimura-2 distribuição gamma 1 (nucleotídeos).

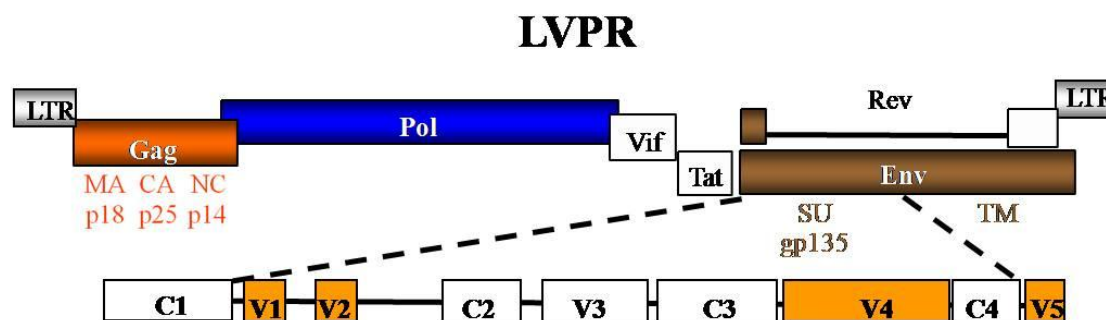


Figura 1. Genoma do lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). Genes estruturais (*gag* e *env*), enzimas virais (*pol*), acessórios (*tat*, *rev* e *vif*) e duas regiões terminais não codificantes (*LTRs*). Na proteína de superfície do gene *env* contém cinco regiões variáveis (V1 a V5) e quatro regiões conservadas (C1 a C4) (Valas *et al.*, 2000). Proteínas: MA= matriz, CA= capsídeo, NC=nucleocapsídeo, SU=superfície e TM=transmembrana.

Quadro 1. Iniciadores utilizados na amplificação dos genes *gag* e *env*.

Gene	Iniciador	Sequência	Orientação	Posição(nt)	Tamanho(pb)	Fonte
	Ptat1	5'-ACAAAGATGGCTAGCWATGCTTAC-3'	senso	5807		
	Penv	5'-ATGCCAGCAATCCAATTCWTGGT-3'	antisenso	8179	2300	
env	A51	5'-TTGCAAAATGGGGATGTCAACC-3'	senso	6353		Germain e Valas, 2006
	B31	5'-GGCATCTTTCTGTACAGGAGACTGCT-3'	antisenso	6719	394	
	567	5'-GGIACIAAIACWAATTGGAC-3'	Senso	7482		Mordasini et al, 2006
	564	5'-GCYAYATGCTGIACCATGGCATA-3'	antisenso	8089	608	
	ENV1	5'-GATATGGTGAACATATGAC-3'	senso	7313		Leroux <i>et al.</i> , 1997
	ENV2	5'-CCATATGRTAAGCTC-3'	antisenso	7842	530	
	GAGf1	5'-TGGTGARKCTAGMTAGAGACATGG-3'	Senso	513		Shah <i>et al.</i> , 2004
gag	P15	5'-GTTATTCATAGGAGGAGCGGACGGCACCA-3'	antisenso	1859	1350	
	MA3f	5'-TAAGGCCTCTGTCGACGGAGCACTTGACAGAAGGAAA-3'	Senso	623		
	NC3r	5'-CAGAATTCGCAAGCTTTGCATTTTAAAYCCTTCKGATC-3'	antisenso	1614	990	

2.5 Análise filogenética

As sequências editadas foram analisadas e comparadas com as sequências das amostras de LVPR CAEV disponíveis no Genbank utilizando-se os programas Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). As árvores filogenéticas foram construídas usando o método Neighbour-Joining (Saitou e Nei, 1987) implementadas em MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) com distância Tamura-Nei e distribuição gamma-1 (Tamura e Nei, 1993). Os limites de confiança das topologias dos filogramas foram determinados pela análise de 1000 replicatas de bootstraps (Felsenstein, 1985).

2.6 Números de acesso das sequências de nucleotídeos

Os número de acesso no GenBank das sequências previamente publicadas e utilizadas neste estudo foram as seguintes: Cork (M33677), 496 (FJ195346), SAOMVV (M31646), K1514 (M60609), EV-1 (S51392), P1OLV (AF479638), 4668 (AY445885), Fonní (JF502416) e Volterra (JF502416) para os genomas completos; 1217 (FJ623126) e 5720 (AY842774) para sequências de env; 85/34 (AY101611), 5720 (AY454218), 5560 (AY454175), 5561 (AY454176), 5586 (AY454186), 5667 (AY454200), ItPi1 (AY265456), It008g03 (EF675999), It030g02 (EF676006), It060s01 (EF676017), It063s01 (EF676018), 2803.34/UM/10 (FR693822), 2357/UM10 (FR693827), 0016 (FJ623120), 4007 (FJ623122), 4819(FJ623122), Brasil (Br/UFRGS-4/C18 (AJ305040), Br/UFRGS-5/C47 (AJ305041), Br/UFRGS-2/C767 (AJ305042) e Br/UFRGS-2/V27 (AJ305039)) para sequências de gag. As sequências deste estudo foram depositadas no Genbank com os números de acessos KF861550 a KF861574 para gene gag (Tabela 2).

3. RESULTADOS

3.1 Análise filogenética baseada na região SU de env

3.1.1 Análise filogenética da região V1/V2 (env)

3.1.1.1 Comparação das sequências

A análise filogenética baseada na região V1-V2 do gene env do CAEV foi realizada em 28 sequências brasileiras, as quais incluíram 23 isolados de CAEV em cultivo celular/tecido oriundo de caprinos e cinco sequências de DNA proviral de sangue (ovino = 1 e caprinos = 4) (Tabela 1, Figura 2). As sequências brasileiras agruparam-se com a estirpe CAEV-cork, o protótipo do grupo genético B de LVPR, formando um clado dentro do subtipo B1; dentre os quais incluiu um ovino (Br198), oriundo do rebanho 15 (Figura 2).

As sequências dos LVPR dos isolados e/ou de DNA proviral de sangue formaram ramificações com 58 a100% de valores de bootstrap. Cinco ramificações terminais com 99 a100% de valor de bootstrap entre elas eram formadas por sequências oriundas de diferentes rebanhos e localizadas em vários estados (Br425-RJ, Br329-PB), (Br198-MA, Br845-MG), (Br53-RN, Br607-MA), (Br634-MA, Br769-BA, Br847-PE), exceto de um, formados pelos isolados Br664 e Br653, oriundos de dois rebanhos localizados no estado do Piauí. O isolado Br845 (MG) formou um ramo de 100% de identidade com a sequência de lentivirus ovino Br198 do rebanho do maranhão. Duas ramificações com 99-100% de valor de bootstrap eram constituídas por isolados do mesmo rebanho obtidos no ano de 1995 (Br842 - Br841 e Br844 - Br843) (Figura 2).

3.1.1.2 Matriz de distância da região V1/V2

A divergência entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de V1/V2 dos

vírus brasileiros variou de 0 a 29% (média = 21,9, SD = 0,021) e 0 a 45,5% (média = 32,9, SD = ,025), respectivamente (Tabela 3). Quando as sequências brasileiras foram comparadas entre os lentivirus do grupo A e B, a divergência variou de 19,8 a 67,7% e 29,9 a 61%, respectivamente (Tabela 3). A média de divergência considerando todas as sequências comparadas foi de 31,9% (DP = 0,023) para nucleotídeo e 39,4 (DP = 0,026) para aminoácidos. A diversidade genética (nucleotídeo) entre os LVPR brasileiros, cork e K1514 foi de 24% e 46%.

3.1.2 Análise filogenética da região V4/V5 (*env*)

Para analisar a variabilidade de epitopos imunodominantes de SU, foi amplificado

um fragmento abrangendo a região c-terminal (V4V5) da glicoproteína de superfície de *env*. As deduções de aminoácidos das sequências brasileiras foram alinhadas com sequências referências correspondentes a ambos os genótipos A (MVV K1514) e B (CAEV cork). O alinhamento das sequências mostrou que a divergência entre as variantes do mesmo genótipo foi concentrada na já descrita região variável dos domínios V4 (c-terminal) e (V5) (Figuras 3 e 4). O domínio V4 incluiu vários resíduos conservados de cisteína e sítios de ligação de n-glicosilação, dos quais foram perfeitamente conservados em todas as sequências tipo CAEV (Figuras 3 e 4).

Tabela 1. Amostras sequenciadas a partir de isolados de LVPR de caprinos e PBL de caprinos e ovinos oriundos da região nordeste e sudeste do Brasil

	Espécie	Isolado		Raça	Espécime	Rebanho		Estado	Região	ENV	ENV	GAG
		Cong.	Animal			Caprino/ Ovino	Propriedade			V1V2	V4V5	MA/CA
1	Caprino	51	05C-RN/09	Toggenburg	MSC	Não	1	RN	NE		x	
2	Caprino	53	06C-RN/09	Toggenburg	MSC	Não	1	RN	NE	x		x
3	Caprino	148	10D-MG/10	Saanen	PBMC cocultivo	Não	2	MG	SE	x		x
4	Caprino	150	14D-MG/10	Saanen	PBMC cocultivo	Não	2	MG	SE	x		x
5	Caprino	168	17E-MG/10	Toggenburg	Plexo coróide	Não	3	MG	SE	x		x
6	Caprino	272	18E-MG/10	Toggenburg	Plexo coróide	Não	3	MG	SE			x
7	Caprino	185	19F-MG/10	Saanen	MSC	Não	4	MG	SE			x
8	Caprino	295	20G-MG/10	Saanen	MSC	Sim	5	MG	SE	x	x	
9	Caprino	195	21G-MG/10	Saanen	MSC	Sim	5	MG	SE			x
10	Caprino	329	24H-PB/10	British alpino	Plexo coróide	Sim	6	PB	NE	x	x	
11	Caprino	387	28L-RJ/10	Saanen	MSC	Não	7	RJ	SE	x	x	x
12	Caprino	425	30M-RJ/10	Saanen	MSC	Não	8	RJ	SE	x	x	x
13	Caprino	423	31N-RJ/10	Saanen	MSC	Não	9	RJ	SE	x	x	
14	Caprino	497	32N-RJ/10	Pardo alpino	MSC	Não	9	RJ	SE			x
15	Caprino	491**	37P-SP/10	Saanen	MSC	Não	10	SP	SE			x
15	Caprino	434**	37P-SP/10	Saanen	Plexo coróide	Não	10	SP	SE		x	
16	Caprino	664	39Q-PI/11	A. nubiano	Plexo coróide	Sim	11	PI	NE	x		x
17	Caprino	638	40R-MA/11	A. nubiano	LBA	Não	12	MA	NE	x		
18	Caprino	607	41S-MA/11	A. nubiano	MSC	Sim	13	MA	NE	x		x
19	Caprino	634	42T-MA/11	Boer	PBMC cocultivo	Sim	14	MA	NE	x		x
20	Caprino	628	43U-MA/11	A. nubiano	MSC	Sim	15	CE	NE	x	x	
21	Caprino	655	44W-CE/11	Saanen	MSC	Sim	16	CE	NE	x	x	x
22	Caprino	653	47V-PI/11	A. nubiano	LBA	Não	17	PI	NE	x		x
23	Caprino	727	48Y-CE/11	A. nubiano	Plexo coróide	Sim	18	CE	NE			x
24	Caprino	769	50X-BA/11	A. nubiano	Plexo coróide	Sim	19	BA	NE	x	x	
25	Caprino	798	51Z-BA/11	Saanen	Plexo coróide	Sim	20	BA	NE			x
26	Caprino	841*	BrMG1 (01)	Sannen	MSC	-	21	MG	SE	x	x	

continua

continuação

	Espécie	Isolado		Raça	Espécime	Rebanho Caprino/ Ovino	Propriedade	Estado	Região	ENV	ENV	GAG
		Cong.	Animal							V1V2	V4V5	MA/CA
27	Caprino	842*	BrMG1 (02)	Sannen	PBMC cocultivo	-	21	MG	SE	x		x
28	Caprino	843*	BrMG2 (01)	Toggenburg	MSC	-	22	MG	SE	x		
29	Caprino	844*	BrMG2 (02)	Toggenburg	MSC	-	22	MG	SE	x	x	x
30	Caprino	845*	BrMG2 (03)	Toggenburg	MSC	-	22	MG	SE	x		x
31	Caprino	847*	BrPe2	Saanen	PBMC cocultivo	-	23	PE	SE	x		
32	Caprino	849*	BrPe1(01)	Saanen	MSC	-	24	PE	NE		x	x
33	Ovino		198	Santa inês	PBL	Sim	15	MA	NE	x		x
34	Ovino		200	Santa inês	PBL	Sim	15	MA	NE			x
35	Caprino		1163	A. nubiano	PBL	Sim	6	PB	NE		x	x
36	Caprino		44	A. nubiano	PBL	Sim	25	PI	NE	x		
37	Caprino		9007	A. nubiano	PBL	Sim	15	MA	NE	x	x	
38	Caprino		7003	A. nubiano	PBL	Sim	15	MA	NE	x	x	
39	Caprino		29	A. nubiano	PBL	-	26	BA	NE			x
40	Caprino		81	Saanen	PBL	Não	27	RJ	SE	x		

A tabela contém informações sobre espécie, identificação do animal, raça, espécimes sequenciados (1 a 32: isolados de tecidos e 33 a 40: isolados de PBL), informação se a propriedade cria ovino e caprino, propriedade, estado, região, amostras sequenciadas e respectivos fragmentos. A identificação do animal (1 a 25) informa a propriedade (letra alfabética), estado brasileiro e ano que foi coletado. Legenda: MSC = membrana sinovial caprina, PBMC = células mononucleares do sangue periférico, LBA = lavado brônquio alveolar, PBL = leucócitos do sangue periférico, (-) = sem informação, cong.= congelamento e Br = Brasil. * sequências de isolados obtidos no ano de 1995 (**negrito**) (Castro *et al.*, 1999); ** Virus isolado de espécimes do mesmo animal (37P_SP/10).

Tabela 2. Números de acesso das sequências de LVPR brasileiras no Genbank

	Espécie	Identificação do LVPR		Nº. de acesso no Genbank
		Nº congelamento	Genbank	GAG
1	Caprino	51	05C-RN/Br	-
2	Caprino	53	06C-RN/Br	KF861569
3	Caprino	148	10D-MG/Br	-
4	Caprino	150	14D-MG/Br	KF861550
5	Caprino	168	17E-MG/Br	KF861554
6	Caprino	272	18E-MG/Br	KF861558
7	Caprino	185	19F-MG/Br	KF861559
8	Caprino	295	20G-MG/Br	-
9	Caprino	195	21G-MG/Br	KF861573
10	Caprino	329	24H-PB/Br	-
11	Caprino	387	28L-RJ/Br	KF861570
12	Caprino	425	30M-RJ/Br	KF861560
13	Caprino	423	31N-RJ/Br	-
14	Caprino	497	32N-RJ/Br	KF861568
15	Caprino	491	37P-SP/Br	KF861565
15	Caprino	434	37P-SP/Br	-
16	Caprino	664	39Q-PI/Br	KF861553
17	Caprino	638	40R-MA/Br	-
18	Caprino	607	41S-MA/Br	KF861561
19	Caprino	634	42T-MA/Br	KF861566
20	Caprino	628	43U-MA/Br	-
21	Caprino	655	44W-CE/Br	KF861552
22	Caprino	653	47V-PI/Br	KF861551
23	Caprino	727	48Y-CE/Br	KF861567
24	Caprino	769	50X-BA/Br	-
25	Caprino	798	51Z-BA/Br	KF861557
26	Caprino	841	BrMG1 (01)	-
27	Caprino	842	BrMG1 (02)	KF861562
28	Caprino	843	BrMG2 (01)	-
29	Caprino	844	BrMG2 (02)	KF861571
30	Caprino	845	BrMG2 (03)	KF861563
31	Caprino	847	BrPe2	-
32	Caprino	849	BrPe1(01)	KF861564
33	Ovino		Br198	KF861572
34	Ovino		Br200	KF861555
35	Caprino		Br1163	KF861574
36	Caprino		Br44	-
37	Caprino		Br9007	-
38	Caprino		Br7003	-
39	Caprino		Br29	KF861556
40	Caprino		Br81	-

A identificação da amostra (1 a 25) informa a propriedade (letra alfabética), estado brasileiro e o país(Br=Brasil). (-) = Não realizado

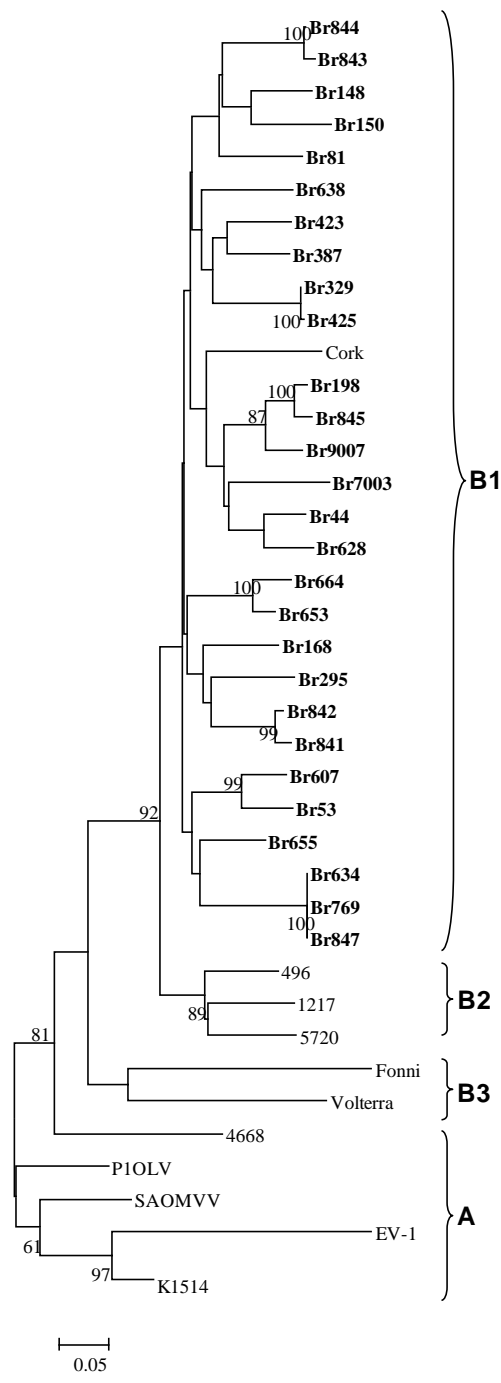


Figura 2. Relação filogenética de seqüências de nucleotídeos de amostras brasileiras de LVPR de caprinos e ovinos. As seqüências são de 327 nt da região V1-V2 do gene ENV do CAEV. A árvore foi construída pelo método Neighbour-Joining. Valores de bootstrap são baseados em 1000 replicatas (todos os valores $\geq 70\%$ estão apresentados nos clados). As 29 seqüências brasileiras estão destacadas (negrito) são apresentadas no dendograma. Amostras seqüenciadas a partir de PBL de caprinos (Br81, Br9007, Br7003 Br44) e ovino (Br198). Os isolados brasileiros de caprinos e as seqüências obtidas a partir sangue de ovino e caprino agruparam no subtipo B1 de LVPR

Tabela 3. Distâncias de nucleotídeo e aminoácidos entre as sequências de V1/V2 de isolados brasileiros e os genótipos de LVPR

	Br 844	Br 843	Br 842	Br 9007	Br 44	Br 81	Br 198	Br 7003	Br 148	Br 295	Br 423	Br 607	Br 628	Br 634	Br 638	Br 664	Br 769	Br 847	Br 653	Br 53	Br 150	Br 168	Br 329	Br 387	Br 425	Br 655	Br 841	Br 845	(B3) Fomni	(B3) Volterra	(B2) 1227	(B2) 496	(B1) Cork	K1514	(A) P1Ov1	(A) 4668	(A) Ev-1	SAOMVV	(B2) 5720	
Br844	1,3	20,5	23,3	20,0	19,6	21,3	21,8	21,9	25,0	16,4	22,6	23,5	25,2	23,8	21,7	25,2	25,2	18,3	23,1	16,9	21,1	22,0	21,5	21,2	18,4	21,0	21,7	54,0	45,7	34,1	27,8	23,2	34,4	38,0	40,8	54,3	37,2	29,9		
Br843	3,9	20,5	23,3	20,0	19,6	22,6	21,8	23,1	25,0	18,6	23,8	23,5	26,5	25,1	21,7	26,5	26,5	19,4	24,3	16,9	22,3	23,2	22,7	22,4	19,5	21,0	22,9	56,3	47,6	32,5	27,8	24,4	35,9	39,7	42,6	56,5	38,8	28,5		
Br842	32,5	31,2		22,1	23,8	21,2	23,6	23,9	22,0	16,1	20,9	22,7	19,3	26,4	22,4	23,8	26,4	20,8	22,2	24,2	16,8	22,6	20,1	23,3	17,8	2,6	22,8	52,1	52,4	27,3	23,3	22,1	46,7	43,0	41,0	64,7	41,9	26,4		
Br9007	39,0	37,7	32,5		13,4	24,8	7,7	13,0	24,6	26,0	19,7	20,2	20,0	27,1	20,8	22,5	27,1	27,1	22,5	20,7	25,6	23,7	17,6	22,1	18,6	21,4	23,8	8,9	59,9	50,7	22,2	24,4	21,4	40,5	31,6	39,1	57,1	42,7	27,6	
Br44	29,9	29,9	39,0	28,6		29,5	17,7	11,6	29,9	25,5	22,6	18,5	10,0	24,9	25,1	19,7	24,9	24,9	18,6	21,4	26,4	21,0	24,0	24,7	25,2	20,9	26,2	20,2	51,6	46,1	23,5	26,6	23,7	41,2	33,9	41,5	59,7	39,0	28,8	
Br81	32,5	33,8	31,2	37,7	39,0		23,4	29,7	20,4	24,9	22,1	26,9	22,2	25,3	19,7	27,4	25,3	22,4	23,6	21,6	24,2	24,3	18,8	24,2	21,3	20,0	23,8	49,5	47,4	32,7	27,9	26,2	43,3	39,0	41,5	59,0	39,0	29,8		
BR198	40,3	41,6	37,7	16,9	35,1	39,0		18,8	21,4	28,6	16,4	21,7	20,2	25,9	17,2	23,2	25,9	23,0	21,6	23,6	26,1	15,4	19,3	16,4	24,9	23,1	3,6	54,9	53,0	24,9	24,9	20,9	41,0	38,3	40,6	58,5	40,3	27,4		
Br7003	32,5	32,5	36,4	20,8	23,4	37,7	35,1		28,3	26,7	23,0	21,0	23,5	26,5	26,5	23,5	26,5	22,3	22,9	25,6	21,5	29,0	26,5	30,2	23,8	26,4	22,1	67,3	44,4	25,4	30,8	20,8	45,9	37,2	41,3	63,7	43,1	31,8		
Br148	35,1	37,7	36,4	32,5	40,3	28,6	33,8	35,1		24,3	23,3	25,1	27,8	23,9	22,2	23,3	23,9	20,6	22,2	14,3	27,3	19,0	21,4	18,9	22,8	23,7	21,8	55,5	51,5	32,1	28,1	29,2	45,3	33,5	41,7	66,8	38,7	27,9		
Br295	33,8	32,5	27,3	35,1	37,7	29,9	40,3	39,0	31,2		23,1	24,7	24,6	27,3	21,5	24,6	27,3	23,1	25,9	26,2	17,2	23,3	20,3	24,4	19,7	15,5	26,2	51,9	51,6	28,8	26,3	21,4	46,4	38,1	40,8	65,7	37,3	31,2		
Br423	23,4	26,0	35,1	28,6	29,9	32,5	28,6	35,1	35,1	33,8		18,2	21,1	23,8	17,4	22,2	23,8	23,8	21,0	18,8	29,0	22,7	17,4	12,5	17,3	20,4	19,3	15,7	50,8	57,2	23,2	23,4	23,0	43,1	42,4	47,4	59,9	43,5	27,3	
Br607	40,3	42,9	41,6	40,3	33,8	33,8	41,6	42,9	39,0	36,4	32,5		20,3	21,3	22,8	19,1	21,3	21,3	17,6	10,7	24,3	21,7	17,1	18,1	18,1	16,5	25,7	20,4	51,9	48,5	26,8	23,6	26,0	46,4	32,3	37,5	63,1	39,1	28,9	
Br628	35,1	35,1	35,1	33,8	11,7	31,2	33,8	32,5	39,0	36,4	26,0	32,5		28,7	24,4	22,0	28,7	28,7	20,2	22,6	27,7	19,5	24,8	24,4	26,0	21,9	22,1	18,4	50,5	46,8	26,8	27,0	26,0	41,7	35,4	41,7	54,1	35,3	28,8	
Br634	33,8	36,4	42,9	37,7	29,9	36,4	37,7	36,4	28,6	36,4	32,5	32,5	35,1		25,9	20,9	0,0	0,0	21,4	23,4	25,9	23,7	26,4	22,9	26,3	17,2	27,1	27,6	48,2	41,0	27,2	29,0	24,2	49,1	39,5	45,7	65,2	42,4	29,3	
Br638	33,8	35,1	36,4	35,1	39,0	29,9	35,1	35,1	31,2	28,6	29,9	35,1	39,0	32,5		23,8	25,9	25,9	22,4	19,9	26,4	23,6	20,3	17,2	20,2	20,0	23,1	14,9	49,0	45,5	22,8	21,2	21,9	39,7	40,0	37,3	62,7	37,6	26,8	
Br664	28,6	28,6	36,4	32,5	19,5	32,5	36,4	31,2	29,9	33,8	32,5	32,5	24,7	33,8		20,9	20,9	5,7	23,2	21,8	19,5	21,2	24,2	22,3	18,0	23,5	23,6	49,5	45,3	26,1	25,9	24,1	42,4	35,9	39,2	53,0	37,1	26,8		
Br769	33,8	36,4	42,9	37,7	29,9	36,4	37,7	36,4	28,6	36,4	32,5	32,5	35,1	0,0	32,5	24,7		0,0	21,4	23,4	25,9	23,7	26,4	22,9	26,3	17,2	27,1	27,6	48,2	41,0	27,2	29,0	24,2	49,1	39,5	45,7	65,2	42,4	29,3	
Br847	33,8	36,4	42,9	37,7	29,9	36,4	37,7	36,4	28,6	36,4	32,5	32,5	35,1	0,0	32,5	24,7	0,0		21,4	23,4	25,9	23,7	26,4	22,9	26,3	17,2	27,1	27,6	48,2	41,0	27,2	29,0	24,2	49,1	39,5	45,7	65,2	42,4	29,3	
Br653	23,4	26,0	31,2	35,1	24,7	28,6	36,4	31,2	26,0	31,2	33,8	32,5	29,9	24,7	28,6	6,5	24,7	24,7		21,4	20,1	16,9	19,0	22,4	20,0	16,5	20,3	25,2	51,0	45,3	28,8	25,3	23,3	43,8	33,7	36,8	56,9	37,6	25,7	
Br531	37,7	40,3	35,1	36,4	31,2	29,9	41,6	37,7	36,4	36,4	32,5	14,3	29,9	28,6	33,8	27,3	28,6	28,6	27,3		25,8	22,2	23,2	21,2	22,5	16,4	23,3	23,2	52,7	50,2	25,3	25,0	24,1	53,5	40,8	39,5	63,4	40,1	30,3	
Br150	29,9	28,6	41,6	40,3	39,0	29,9	41,6	41,6	22,1	31,2	37,7	37,7	40,3	35,1	35,1	28,6	35,1	35,1	26,0	39,0		27,4	26,1	23,2	26,6	24,9	26,6	23,3	57,8	48,6	37,6	33,6	29,2	41,7	36,4	44,8	59,4	36,8	33,9	
Br168	29,9	31,2	26,0	35,1	31,2	31,2	39,0	33,8	35,1	31,2	33,8	37,7	32,5	28,6	27,3	27,3	28,6	28,6	26,0	31,2	39,0		22,4	20,1	23,5	16,5	18,3	27,2	51,6	47,8	28,1	26,4	23,3	41,7	42,7	40,6	57,3	39,3	28,8	
Br329	36,4	39,0	41,6	36,4	42,9	35,1	37,7	45,5	32,5	37,7	32,5	31,2	45,5	35,1	35,1	36,4	35,1	35,1	33,8	36,4	36,4	35,1		15,6	0,6	19,4	21,9	16,8	53,3	50,3	28,3	27,2	26,9	42,8	38,3	41,5	62,7	42,4	26,6	
Br387	31,2	33,8	37,7	37,7	35,1	27,3	33,8	41,6	35,1	27,3	24,7	29,9	35,1	31,2	27,3	35,1	31,2	31,2	35,1	35,1	36,4	29,9	27,3		16,6	19,2	18,4	17,5	42,1	45,5	20,5	25,0	23,9	40,8	43,1	42,9	55,6	41,5	25,1	
Br425	36,4	39,0	41,6	36,4	42,9	35,1	37,7	45,5	32,5	37,7	32,5	31,2	45,5	35,1	35,1	36,4	35,1	35,1	33,8	36,4	36,4	35,1	0,0	27,3		18,4	22,4	17,8	54,1	50,1	28,1	27,3	28,1	43,0	39,3	42,6	64,4	41,7	26,5	
Br655	28,6	29,9	29,9	33,8	29,9	26,0	37,7	36,4	32,5	29,9	32,5	31,2	33,8	23,4	28,6	22,1	23,4	23,4	22,1	22,1	36,4	20,8	31,2	22,1	36,4	20,8	31,2	22,1	26,6	49,3	39,6	23,0	25,8	22,2	41,0	41,2	32,7	58,2	39,6	24,0
Br841	31,2	29,9	3,9	35,1	39,0	29,9	37,7	40,3	37,7	26,0	33,8	41,6	35,1	44,2	37,7	36,4	44,2	44,2	31,2	35,1	41,6	27,3	39,0	33,8	39,0	31,2		22,3	47,1	57,9	29,9	23,2	20,6	47,4	45,2	43,1	67,7	44,9	27,6	
Br845	39,0	40,3	35,1	16,9	33,8	39,0	5,2	37,7	33,8	35,1	23,4	37,7	29,9	37,7	29,9	36,4	37,7	37,7	36,4	40,3	39,0	37,7	35,1	28,6	35,1	37,7	35,1	54,9	54,1	26,9	26,6	19,8	44,7	38,0	43,8	60,9	45,3	29,9		
Fomni	46,8	46,8	49,4	54,5	51,9	49,4	53,2	59,7	54,5	50,6	46,8	46,8	46,8	48,1	50,6	45,5	48,1	48,1	48,1	48,1	49,4	48,1	53,2	42,9	53,2	48,1	46,8	51,9		41,6	56,3	50,3	57,5	49,7	58,1	51,4	72,0	44,2	44,6	
Volterra (B3)	50,6	53,2	53,2	53,2	50,6	53,2	57,1	49,4	54,5	53,2	51,9	46,8	53,2	46,8	49,4	50,6	46,8	46,8	49,4	46,8	55,8	48,1	51,9	46,8	51,9	44,2	55,8	57,1	48,1		39,4	53,9	50,7	42,3	43,0	42,8	64,7	44,6	39,1	
1217 (B2)	44,2	41,6	40,3	31,2	29,9	48,1	36,4	33,8	41,6	40,3	36,4	41,6	35,1	37,7	40,3	35,1	37,7	37,7	39,0	39,0	44,2	37,7	45,5	37,7	45,5	35,1	44,2	39,0	54,5	45,5		16,5	30,5	38,3	33,6	38,6	59,3	41,5	17,9	
496 (B2)	39,0	37,7	32,5	33,8	35,1	40,3	37,7	36,4	35,1	33,8	33,8	36,4	39,0	33,8	35,1	33,8	33,8	35,1	32,5	41,6	33,8	42,9	39,0	42,9	35,1	33,8	37,7	48,1	53,2	26,0		31,2	40,5	34,5	37,5	59,4	41,0	18,4		
Cork (B1)	37,7	39,0	33,8	35,1	35,1	32,5	37,7	37,7	45,5	33,8	35,1	40,3	37,7	35,1	32,5	36,4	35,1	35,1	32,5	36,4	46,8	36,4	41,6	36,4	41,6	32,5	32,5	36,4	55,8	57,1	46,8	39,0		49,5	46,2					

No domínio V4, três animais apresentaram significativa e consistente divergência das sequências de aminoácidos. O vírus isolado de caprino Br849 (BrPe1 (01), Castro et al. 1999), classificado como CAEV no gene *gag*, apresentou a deleção de aminoácidos (resíduos 60 a 65) que é normalmente observada nas sequências de MVV (Figura 3). Enquanto que, a sequência da amostra Br1163, nesta mesma posição, apresentou a inserção de um novo motivo (resíduos 55 a 65) ligado por dois resíduos de cisteína (Figura 3). O isolado Br195, classificado como MVV (grupo A) na análise do gene *gag* (Figuras 5 e 6), não apresentou a deleção típica de MVV no gene *env* da região V4 (Figura 4). Na tabela 6 destaca os principais achados obtidos nestas sequências.

2.2 Análise filogenética baseada na região MA/CA (*gag*)

2.2.1 Comparação das sequências

Para concluir a caracterização filogenética das estirpes brasileiras, um fragmento do gene *gag* de 990 nt abrangendo a região de CA/MA foi amplificado de isolados de LVPR caprinos (n=23) e DNA proviral de ovinos e caprinos (MA: ovino=2 e PB: caprino=1) (Tabela 1). A análise filogenética foi realizada baseada na região CA (467nt) cuja sequência é a mais representativa da maioria dos subtipos de LVPR disponíveis. As sequências de lentivirus brasileiras alinharam-se com as sequências referências de LVPR dos grupos A e B. Os lentivirus ovinos brasileiros segregaram para o subtipo B1, enquanto que, os lentivirus caprinos agruparam-se no subtipo B1 e ainda para dois prováveis novos subtipos no genótipo A, o qual foi baseado no significativo valor de bootstrap (92%). Estes lentivírus caprinos são o isolado Br195 e a sequência Br1163 (PBL), que formaram uma ramificação com o isolado brasileiro ovino do Rio grande do Sul V27 (acesso genbank: AJ305039) e o

MVV K1514 (acesso genbank: M60609), respectivamente (Figura 5).

A topologia do dendograma apresentou formação de táxons constituídos por isolados brasileiros de LVPR oriundos de estados das regiões NE e SE do Brasil. Dois táxons foram constituídos por sequências de LVPR brasileiras isoladas no ano de 1995 (Br848 ou Br845 e Br844) e os isolados brasileiros do RS (C18 e C767 ou C47) (acesso genbank: AJ305040-C18; AJ305041- C47; AJ305042- C767). Doze fazendas tinham produção consorciada de caprinos e ovinos, dentre as quais o rebanho n° 15, que apresentou lentivirus de caprinos e ovinos (Br200 e Br198) agrupados no subtipo B1 (Tabelas 1 e 6, Figuras 2 e 5).

2.2.2 Matriz de distância do gene *gag* (MA/CA)

A divergência entre as sequências de nucleotídeos e aminoácidos de MA/CA dos vírus candidatos aos novos subtipos (Br1163 e Br195) variou de 11,7 a 41 e 3,6 a 19,4, respectivamente (Tabela 4). A diversidade das sequências de nucleotídeos e aminoácidos entre estes dois supostos subtipos com aqueles dos grupos A e B é demonstrado na Tabela 5. As divergências de nucleotídeos e aminoácido das sequências de Br1163 e Br195 foram comparadas com K1514, Cork, os isolados deste estudo, V27 e entre eles e destacas na Tabela 4.



Figura 4. Alinhamento de dedução de seqüências de aminoácidos de LVPR da região V4 do gene *env* (379 nt). As seqüências de aminoácido dos isolados brasileiros de caprinos, inclusive Br195, que não foram amplificadas em V4V5, foram amplificadas com os iniciadores Env1/Env2 e alinhadas com seqüências referências do genótipo A (K1514) e B (cork). A região variável V4 de SU5 previamente identificada está delimitadas na região superior por linha tracejada. (*), resíduo de cisteína conservada; (---), sítio de N-glicosilação (NXS ou NXT, X = algum resíduo), (.), resíduo conservado. A seqüência Br195 é oriunda de caprino e foi classificada pela dedução de aminoácidos do gene *env* (domínio V4) como CAEV, indicado pela ausência de deleção de aminoácidos no domínio V4

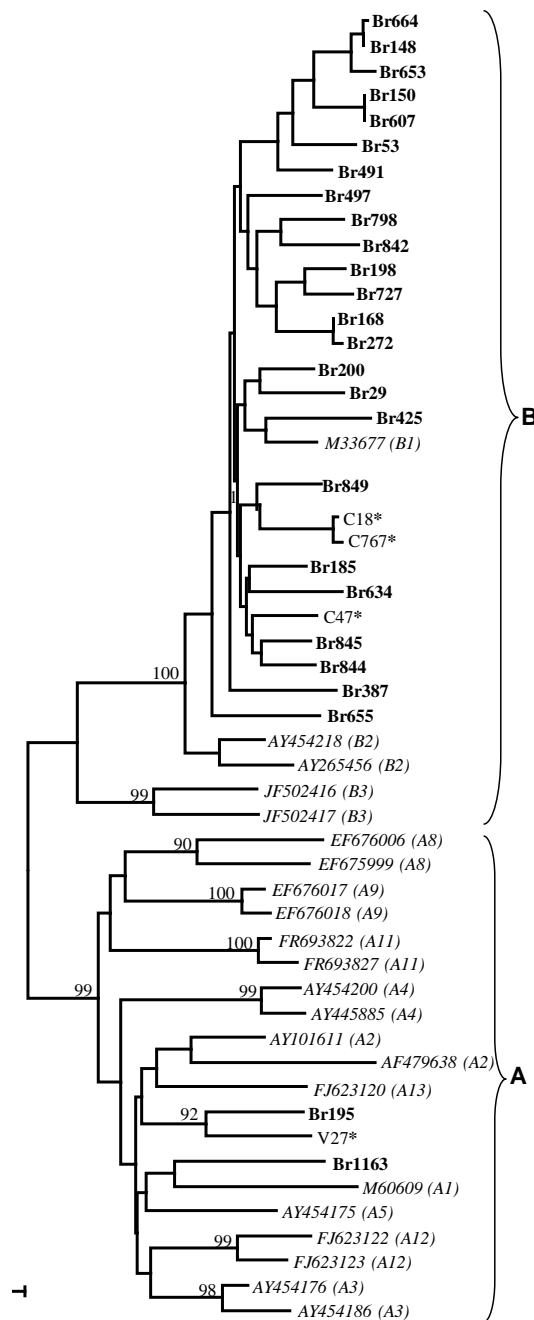


Figura 5. Relação filogenética de seqüências de nucleótidos (*gag*) de amostras brasileiras de LVPR de caprinos e ovinos. As seqüências são fragmentos de 467 nt do CA do gene *gag* do CAEV. A árvore foi construída pelo método Neighbour-Joining. Valores de bootstrap são baseados em 1000 replicatas (todos os valores $\geq 70\%$ estão apresentados nos clados). São apresentados no dendograma os isolados e amostras de LVPR de caprinos e ovinos de regiões brasileiras (destacados em negrito). As amostras com asterísco são seqüências brasileiras ((AJ305040)C18; (AJ305041) C47; (AJ305042) C767; (AJ305039) V27) previamente depositadas no genbank (Ravazzolo *et al.*, 2001). As seqüências Br198 e Br200 são oriundas de ovinos, foram agrupadas no subtipo B1 dos LVPR. As seqüências de LVPR Br195 (isolado) e Br1163 (PBL) são de caprinos e foram agrupadas no grupo A dos LVPR.

Tabela 4. Divergência de nucleotídeos e aminoácidos do gene *gag* das amostras Br1163 e Br195.

Divergência		Grupo		K1514	Cork	Br B1	C27	Br195/Br1163
		A	B					
Br1163	Nucleotídeo	16,6 a 27,9	23,9 a 41	19,8	33,9	36,20	20,6	18,3
	Aminoácido	4,3 a 10,8	13,7 a 19,4	7,2	15,8	17,1	10,8	8,6
Br195	Nucleotídeo	11,7 a 26,7	26,1 a 39,1	22,70	33,50	33,9	11,7	18,3
	Aminoácido	3,6 a 9,4	12,2 a 9,4	5	14,4	15,3	3,6	8,8

Distâncias genéticas (expressada como porcentagem do tamanho de MA/CA (947 nt))

Tabela 5. Matriz de comparação das distâncias genéticas de nucleotídeos e aminoácidos entre sequências do gene *gag* (MA/CA) e subtipos de LVPR

	Br_B1	Br1163(A)	Br195 (A)	Br(B1) Rav	C27* (A)	A13	A12	Cork (B1)	B2	B3	K1514 (A1)	A2	A3	A4	A5	A8	A9	A11
BrB1		35,8	33,9	12,0	33,7	34,3	33,3	11,1	14,2	25,4	37,2	34,2	31,4	32,9	31,7	33,9	31,7	32,4
Br1163(A)	17,1		18,3	34,7	20,6	18,7	19,7	33,9	30,1	24,0	19,2	18,2	17,1	25,9	18,1	20,2	19,8	20,1
Br195(A)	15,3	8,6		33,0	11,7	18,1	19,2	33,5	31,1	26,2	22,7	18,7	16,5	19,1	16,8	25,0	21,9	23,3
Br (B1)	9,1	18,0	15,6		34,7	32,3	32,9	9,9	14,5	24,4	36,9	35,0	31,4	34,2	28,9	34,0	29,3	31,6
Br Rav (A)	17,5	10,8	3,6	18,7		20,2	19,5	31,4	29,8	32,4	24,0	20,3	18,4	22,4	17,6	24,4	21,1	21,7
A13	16,0	7,9	3,6	17,3	5,8		16,9	33,3	28,4	29,1	22,3	17,7	17,0	17,7	18,7	22,4	21,7	20,9
A12	15,6	6,5	4,7	17,3	6,8	4,7		31,5	27,9	26,2	21,3	18,5	15,5	22,2	19,0	20,5	20,3	16,7
Cork (B1)	7,4	15,8	14,4	7,0	16,5	15,1	14,0		12,9	25,4	36,7	32,5	27,3	31,4	31,3	32,1	30,6	29,9
B2	6,4	15,8	13,7	6,6	15,8	14,4	13,7	4,0		22,0	31,0	28,3	27,0	30,9	27,7	31,2	30,8	29,4
B3	8,2	13,7	13,3	10,0	15,5	13,3	12,2	7,6	5,4		31,0	28,0	26,0	30,3	29,5	27,7	26,7	28,2
K1514(A1)	16,5	7,2	5,0	18,0	7,2	4,3	4,0	14,4	15,1	13,3		24,3	19,7	20,9	18,8	22,2	21,6	22,4
A2	15,6	6,8	5,0	16,9	7,2	4,3	4,0	14,4	14,0	12,6	3,2		20,4	21,8	20,2	25,6	23,0	23,6

Distâncias genéticas (expressada como porcentagem do tamanho de MA/CA (947 nt)) estão presentes na matriz triangular. As distâncias de aminoácidos estão apresentadas na metade inferior de cada matriz e as distâncias de nucleotídeos estão na metade superior de cada matriz.

Enquanto que, a divergência de nucleotídeos e aminoácidos entre os isolados brasileiros variaram de 0 a 41 (média = 15,1, DP = 0,013) e 0 a 19,4% (média = 9,3% DP = 0,014), respectivamente (Tabela 5). Excluindo as sequências de Br1163 e Br195 a divergência de nucleotídeos e aminoácidos variou de 0,2 a 17,9% (média 11,5, DO = 0,013) e 0 a 14,4% (média = 7,8, DP = 0,013), respectivamente. Estes achados suportam fortemente a existência de dois novos subtipos, que poderiam ser, provisoriamente, denominados: A14 (Br195 e C27) e A15 (Br1163).

2.2.3 Análise da conservação das regiões imunodominantes de MA/CA

Para analisar a conservação das sequências dos domínios imunodominantes de CA/MA, os quais identificam CAEV e MVV, e confirmar a caracterização dos vírus, a dedução de aminoácidos do gene *gag* (990 nt) foi alinhada com as sequências referências correspondentes aos genótipos B (cork) e A (K1514) (Figura 6).

Apesar da variabilidade das sequências de nucleotídeos, os epitopos imunodominantes foram conservados, especialmente o da região da matriz (MA). O epitopo imunodominante localizado na região n-terminal da proteína da matriz (Figura 6, epitopo 1) foi bem conservado entre os lentivirus caprinos e ovinos. Em contraste, o epitopo imunodominante do capsídeo não

foi tão conservado entre os lentivirus caprinos (Figura 6 epitopo 2). Na porção n-terminal do epitopo de CA as amostras Br53 (PPA₁₉₄) e Br387 (PPAG₁₉₄) apresentaram deleções de três e quatro aminoácidos, respectivamente (Figura 6, epitopo 2). Na região c-terminal de MA (Figura 6, VR-1) o lentivirus ovino Br198 apresentou inserção de um aminoácido (E₈₇), enquanto o isolado caprino Br844 a deleção de dois aminoácidos (aa₈₃).

A região de homologia principal (MHR₂₄₈₋₂₇₀) foi menos conservada e apresentou 69 substituições de aminoácidos, dentre as principais; K₂₅₄→ R (Br1163), R₂₆₅→ K (Br198), Y₂₅₉→ F (Br195), T₂₅₅→ I (Br425), P(Br387) e N₂₅₆→S (Br727), A (Br1163), enquanto as outras demonstraram menor importância, pois foram mais conservativas (Valas *et al.*, 1997). Os resíduos Q₂₅₃, E₂₅₇, F₂₆₂ e R₂₆₅, considerados conservativos entre os diferentes retrovírus,

mantiveram-se conservados, com exceção da amostra Br198 (R₂₆₅→ K). A região carboxi-terminal do domínio CA foi relativamente conservada em ambos os grupos MVV e CAEV (Figura 6).

As 24 sequências brasileiras agrupadas no grupo B (ovinos: n=2 e caprino: n=22), continham sete deleções de aminoácidos (aa₉₃) na região C-terminal da proteína MA, sendo observadas em todas as sequências de CAEV. Enquanto que, Br195 e Br1163, juntamente com cepa de referência K1514, não apresentaram esta deleção (Figura 6). Os caprinos e ovinos de genótipo B continham a dupla glicina (GG₁₉₇), característico das linhagens de CAEV, na parte central da proteína CA. Enquanto os lentivirus Br195 e Br1163 e a sequência V27 do RS (acesso genbank: AJ305039) apresentavam a deleção deste motivo “GG” e foram similares ao protótipo MVV (K1514) (Figura 6).

Tabela 6. Destaque dos principais achados obtidos em análise filogenética das sequências brasileiras de LVPR

Espécie	Amostra SRLV	Data Coleta	Dendograma		Dedução de aminoácidos		Divergência Nt (gag-CA) %	
			<i>gag</i> (CA)	<i>env</i> (V1/V2)	<i>gag</i> (MA/CA)	<i>env</i> -SU5 V4/V5	MVV K1514	CAEV Cork
Caprino	Br195	2010	Grupo A	Grupo A	Grupo A	Grupo B	22,7	33,9
	Br849	1995	Subtipo B1	-	Grupo B	Grupo A	37,3	9
	Br1163	2011	Grupo A	Grupo A	Grupo A	Mutação	19,8	33,5
Ovino	Br198	2011	Subtipo B1	Subtipo B1	Grupo B	Grupo B	34,5	9,4
	Br200	2011	Subtipo B1	-	Grupo B	Grupo B	36,8	9

Na análise de aminoácidos da região SU5 (*env*) os isolados brasileiros Br195 e Br849 foram classificados em um grupo diferente daquele obtido na análise filogenética de CA (*gag*) e V1/V2 (*env*) e a amostra Br1163 apresentou uma mutação (inserção de um novo motivo). Grupo A = Tipo MVV, Grupo B = Tipo CAEV, Nt- nucleotídeos.



Figura 6. Alinhamento de dedução de seqüências de aminoácidos de SRLV da região do gene *gag* (MA/CA) (947 nt). As seqüências de aminoácido de 23 estirpes de LVPR de caprinos e três seqüências de LVPR obtidas a partir de PBL (ovino = 2 e caprino = 1) foram alinhadas com as seqüências de referências do genótipo A (K1514) e B (cork). A região de homologia principal (MHR) no domínio CA, tanto quanto os epitopos imunodominantes das proteínas MA (epitopo 1) e CA (epitopo 2 e 3) estão destacadas dentro de retângulo contínuo e não contínuo (epitopo VR-1). As seqüências Br195 (isolado) e Br1163 (PBL) são de caprinos e foram identificadas como MVV, indicado pela deleção de dois aminoácidos no centro da proteína CA, presente em todas as seqüências de MVV (grupo A). (*), resíduo de cisteína conservada; (---), sítio de N-glicosilação (NXS ou NXT, X = algum resíduo); (.), resíduo conservado.

4. DISCUSSÃO

O sequenciamento parcial dos genes *gag* (MA/CA) e *env* (V1V2, V4/V5) e a análise filogenética revelaram que CAEV e MVV estão presentes em ambas as espécies nestes rebanhos, incluindo subtipo B1 em ovinos e caprinos, e em dois heterogêneos e prováveis novos subtipos A ocorrendo em caprinos. A análise de aminoácidos da região V4/V5 (SU) identificou provável recombinação ou coinfeção de LVPR ocorrendo em caprinos.

Quarenta amostras de lentivirus, incluindo 33 isolados de caprinos e sete DNA proviral de sangue (ovinos, n = 2 e caprinos, n= 5), foram agrupadas no subtipo B1. Este genótipo é estreitamente relacionado com amostra Cork CAEV, possuindo características de homogeneidade entre as sequências que o compõem e é constituído pelos isolados de LVPR de caprinos mundialmente distribuídos (Shah *et al.*, 2004a), inclusive isolados brasileiros descritos anteriormente (Ravazzolo *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2004; Feitosa *et al.*, 2010), sugerindo que a importação de caprinos geneticamente melhorados contribuiu significativamente para o estabelecimento destes variantes de LVPR no Brasil. Entretanto, neste estudo dois lentivirus ovinos (Br198 e Br200) agruparam-se no subtipo B1, evidenciando mais uma vez que este subtipo integra os lentivirus de ovinos e caprinos, como relatado por Germain e Valas (2006). Os ovinos eram oriundos de um rebanho misto (n.15) no estado do Maranhão (NE) e também incluiu três lentivirus de caprinos (Br7003, Br9007 e Br628), o que corroborou com a possibilidade da transmissão natural de LVPR interespecie entre ovino e caprino (Castro *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2004b; Pisoni *et al.*, 2006; Gjerset *et al.*, 2007) e com a inédita detecção da infecção do subtipo B1 em ovinos no Brasil.

Baseado nas sequências do capsídeo, os lentivirus de dois caprinos (Br195 e Br1163) integraram dois clados diferentes no heterogêneo grupo A. A distância genética destes com outros vírus do grupo A variou de 16,6 a 27,9%. Em acordo com os critérios descritos por Shah *et al.* (2004a) as sequências de um genótipo que diferem mais que 15% (genes *gag* e *pol*), representam distintos subtipos, o que sugere novos subtipos dentro deste grupo A. Considerando a distância genética de 11,7% e um bootstrap de 92% entre as estirpes brasileiras Br195 e V27 (acesso genbank: AJ305039), podem integrar um novo subtipo. Embora a estirpe brasileira Br1163 e o MVV 1514 tenham se agrupado juntos, a distância de 19,8% discorda que eles integram o mesmo subtipo A1. Sequências adicionais de vírus deste novo subtipo são necessárias para o estabelecimento do novo subtipo.

A região V4 e V5 exibiram um elevado grau de variabilidade, como previamente relatado (Valas *et al.*, 2000). A divergência de aminoácido foi principalmente observada abrangendo o domínio c-terminal das regiões V4 e V5 para ambos os genótipos A e B. A região c-terminal de SU5 (V5) é reportada como importante domínio imunogênico que confere a resposta tipo - específica (Mordasini *et al.*, 2006; Carozza *et al.*, 2009). O domínio V4 integra um epitopo de neutralização conformacional de alta variabilidade durante a infecção persistente de LVPR (Hotzel *et al.*, 2002), o qual é um sítio de ligação para receptor celular (Skraban *et al.*, 1999) e é análogo à região V3 do vírus HIV-1 (Zhang *et al.*, 1997; Skraban *et al.*, 1999). Nesta região o lentivirus brasileiro Br1163 apresentou a inserção de um novo motivo (KGKCQANETCR) ligado por dois resíduos de cisteína, representando um domínio imunogênico distinto (Gjerset *et al.*, 2006) e um importante fator que determina variantes de neutralização de LVPR com escape à resposta imune (Hotzel *et al.*,

2002), sustentando o papel da seleção positiva (Zhang *et al.*, 1997). Adicionalmente, a região V4 continha vários resíduos conservados de cisteína e sítios de n- glicosilação (Knowles *et al.*, 1991; Valas *et al.*, 2000), sendo a glicosilação mais conservada entre as sequências CAEV-like. A conservação dos sítios de n-glicosilação na região V4 de CAEV-SU está relacionada à capacidade do vírus em escapar da neutralização da resposta imune do hospedeiro (Valas *et al.*, 2000).

A análise de dedução de aminoácidos das sequências revelou um grau relativo de similaridade na região CA (similaridade: B= 92,2%, A=94%) entre os vírus brasileiros e referências de cada grupo A e B. A identidade de sequência entre o subtipo B1 e B2 foi de 93,6%, enquanto que as identidades entre A1, A14 (Br195) e A15(Br1163) foram 95% e 92% respectivamente. Em contraste, a região V1/V2 (*env*) dos lentivirus brasileiros apresentou alta diversidade genética, indicando a grande distância com os protótipos do grupo A e a comprovação da característica hipervariável destes domínios, pois segundo Valas *et al.* (2000) a região V1 seguida de V2 é a mais variável de SU

O epitopo imunodominante de CA (epitopo 2, Figura 6 apresentou uma porção n-terminal comum entre o grupo A e B (LNEEAERW) e c-terminal distinto entre os grupos A (VRQNPPGPN) e (RRNNPPPPA) de LVPR brasileiros, como relatado anteriormente (Grego *et al.*, 2002; Rosati *et al.*, 2004). Essa relação também foi observada no epitopo de MA (epitopo 1, Figura 6). A conservação dos epitopos das principais proteínas estruturais dos genótipos de LVPR induz a reação cruzada entre os lentivirus ovinos e caprinos (Gogolewski *et al.*, 1985), enquanto que a variação na porção c-terminal dos epitopos do capsídeo e da matriz relaciona-se a resposta tipo específica (Rosati *et al.*, 2004; Grego *et al.*, 2005; Lacerenza *et al.*, 2006).

Deleções, envolvendo os resíduos glicina e prolina, na porção n-terminal do epitopo 2 foram observadas nos isolados Br387 (PPAG₁₉₄) e Br53 (PPA₁₉₄) conforme descrito previamente na amostra francesa CA680 (Valas *et al.*, 1997). Na porção c-terminal do domínio MA ocorreram uma inserção (Br198, E₈₇) e duas deleções (Br844, aa₈₃) de aminoácidos. Nesta posição c-terminal da proteína da MA foi identificada recentemente uma região variável (V-R1, CAEV cork nucleotídeos 900-910) (Santry *et al.*, 2013).

Nesse estudo as estirpes de LVPR circulantes no Brasil apresentaram uma porção amino-terminal comum e c-terminal variável nos epitopos 1 e 2 das proteínas da MA e CA de cada grupo A e B e conservação no epitopo localizado na região carboxi-terminal do capsídeo (Grego *et al.*, 2002). Adicionalmente, há uma conservação da proteína gag das estirpes de LVPR brasileiras, o que é importante para o diagnóstico ou para manutenção da reatividade cruzada entre MVV e CAEV quando utiliza antígeno heterólogo (Grego *et al.*, 2002). Entretanto, algumas sequências de LVPR de caprinos e ovinos apresentam mutações em regiões imunodominantes, sugerindo que a pressão do sistema imune do hospedeiro ou fatores específicos do vírus regula estas alterações (Zhang *et al.*, 1997; Santry *et al.*, 2013).

A região de homologia principal (MHR) é conservada em todos os retrovirus com importante função na replicação viral (Mammano *et al.*, 1994), e os lentivirus analisados neste estudo apresentaram moderada variação, na maioria conservativa, como relatado anteriormente em outras estirpes brasileiras de LVPR (Ravazzolo *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2004) e por Valas *et al.* (1997). Segundo Mammano *et al.* (1994), as mutações conservativas na porção invariável ou na região conservada c-terminal de MHR causa apenas uma diminuição da replicação, enquanto aquelas

não conservativas K₂₅₄→R (Br1163), R₂₆₅→K (Br198), Y₂₅₉→F (Br195), T₂₅₅→I (Br425), P(Br387) e N₂₅₆→S (Br727), A (Br1163) podem reduzir a multimerização da proteína.

A dedução de aminoácidos ajudou a concluir a caracterização genética de algumas estirpes brasileiras, e todas as sequências do dendograma de *gag* (CA) classificadas como genótipos A e B foram consistentes com a análise de aminoácido das regiões MA e CA do gene *gag*. Entretanto, a análise de V4/V5 (gene *env*) revelou sequências discordantes agrupado dentro do subtipo A e B, de dois isolados de caprinos: o vírus Br195 de genótipo A (gene *gag*) foi caracterizado como genótipo B na análise de aminoácido de V4/V5, enquanto Br849 classificado como subtipo B1 (gene *gag*) neste estudo, e previamente reportado como MVV (Castro *et al.*, 1999b), foi caracterizado como MVV-like (genótipo A) (Tabela 6).

Estas duas estirpes e Br1163 estavam relacionadas a uma provável coinfeção de animais com CAEV e MVV ou recombinação entre estes lentivírus (Pisoni *et al.*, 2007; Olech *et al.*, 2012; Santry *et al.*, 2013), evidenciando a seleção ou pressão seletiva imunológica e a necessidade de variação antigênica do vírus para escapar da resposta imune do hospedeiro (Valas *et al.*, 2000).

Este estudo retratou a atual situação epidemiológica da infecção de LVPR no Brasil, com a circulação de prováveis novos subtipos em caprinos e de LVPR recombinantes ou a co-infecção ocorrendo em diferentes regiões do Brasil. Existe, portanto, a evidência de transmissão de CAEV interespecie de caprino e ovino ocorrendo no Brasil. Estes achados podem interferir no diagnóstico sorológico de LVPR e justifica a implantação de medidas de controle para LVPR no Brasil considerando as espécies de caprinos e ovinos.

5. CONCLUSÕES

A caracterização genética evidenciou, principalmente, os subtipos B1 de LVPR infectando rebanhos de caprinos brasileiros, entretanto, os LVPR de ovinos podem ser classificados dentro do mesmo subtipo, comprovando a transmissão natural de CAEV entre as espécies de caprinos e ovinos no Brasil. Adicionalmente, dois LVPR de caprino foram classificados com o genótipo A e com alta diversidade genética comparada àqueles subtipos existentes.

Dois LVPR de ovinos foram identificados pela primeira vez no Brasil o subtipo B1, grupo genético de CAEV.

As regiões imunodominantes da matriz e capsídio foram conservadas na porção n-terminal e variável na porção c-terminal dos epitopos da matriz e capsídeo. O epitopo c-terminal de CA foi conservado, enquanto MHR apresentou mutações conservativas e não conservativas.

A recombinação ou coinfeção de LVPR ocorreu em três caprinos oriundos dos estados de Pernambuco (Br849), Minas Gerais (Br195) e Paraíba (Br1163). Dois vírus (Br849 e Br195) apresentaram características de MVV e CAEV, enquanto o outro (Br195) uma inserção de novo motivo na principal região imunogênica de SU4, caracterizada como medida de escape do vírus ou seleção imune, a qual pode influenciar o diagnóstico sorológico nos rebanhos brasileiros.

A recombinação viral tem ocorrido previamente nos rebanhos brasileiros, uma vez que o vírus Br849 foi isolado no ano de 1995, e 17 anos depois foi identificado com dupla característica de MVV e CAEV.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O. *et al.* Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the cariri region, paraíba state, brazil. *Veterinary Journal*, v. 180, n. 3, p. 399-401, 2009.
- BERTOLOTTI, L.; MAZZEI, M.; PUGGIONI, G. *et al.* Characterization of new small ruminant lentivirus subtype b3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *The Journal of General Virology*, v. 92 n. 8, p. 1923-1929., 2011.
- BERTONI, G.; HERTIG, C.; ZAHNO, M. L. *et al.* B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus and antibody response in infected goats. *The Journal of General Virology*, v. 81, n. Pt 12, p. 2929-2940, 2000.
- BLACKLAWS, B. A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, n. 3, p. 259-269, 2012.
- BOHLAND, E.; D'ANGELINO, J. L. Artrite encefalite caprina: Avaliação dos aspectos produtivos e reprodutivos de animais infectados e não infectados *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 42, n. 2, p. 81-88, 2005.
- CARROZZA, M. L.; MAZZEI, M.; LACERENZA, D. *et al.* Seroconversion against su5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different srlv genotypes. *Veterinary Microbiology*, v. 137, n. 3-4, p. 369-374, 2009.
- CASTRO, R. S.; GREENLAND, T.; LEITE, R. C. *et al.* Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *The Journal of General Virology*, v. 80 n. 7, p. 1583-1589, 1999.
- FEITOSA, A. L. V. L.; DA SILVA TEIXEIRA, M. F.; PINHEIRO, R. R. *et al.* Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from northern brazil. *Small Ruminant Research*, v. 94, n. 1, p. 205-209, 2010.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FEVRE, E.; BRONSVOORT, B.; HAMILTON, K. *et al.* Animal movements and the spread of infectious diseases. *Trends Microbiol*, v. 14, p. 125 - 131, 2006.
- GERMAIN, K.; VALAS, S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected french sheep. *Virus research*, v. 120, p. 156-162, 2006.
- GIAMMARIOLI, M.; BAZZUCCHI, M.; PUGGIONI, G. *et al.* Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (srlv) in italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes*, v. 43, n. 3, p. 380-384, 2011.
- GJERSET, B.; STORSET, A. K.; RIMSTAD, E. Genetic diversity of small-ruminant lentiviruses: Characterization of norwegian isolates of caprine arthritis encephalitis virus. *The Journal of General Virology*, v. 87, n. Pt 3, p. 573-580, 2006.
- GOGOLEWSKI, R. P.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C. *et al.* Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *The Journal of General Virology*, v. 66 (Pt 6), p. 1233-1240, 1985.
- GREGO, E.; BERTOLOTTI, L.; CARROZZA, M. L. *et al.* Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 106, n. 3-4, p. 179-185, 2005.
- GREGO, E.; BERTOLOTTI, L.; QUASSO, A. *et al.* Genetic characterization of small ruminant lentivirus in italian mixed flocks: Evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *The Journal of General Virology*, v. 88, n. 12, p. 3423-3427, 2007.

- GREGO, E.; PROFITI, M.; GIAMMARIOLI, M. *et al.* Genetic heterogeneity of small ruminant lentiviruses involves immunodominant epitope of capsid antigen and affects sensitivity of single-strain-based immunoassay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 9, n. 4, p. 828-832, 2002.
- HERRMANN-HOESING, L. M. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, v. 22, p. 843-855, 2010.
- HOTZEL, I.; KUMPULA-MCWHIRTER, N.; CHEEVERS, W. P. Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein during persistent infection. *Virus Research*, v. 84, n. 1-2, p. 17-25, 2002.
- KNOWLES, D. P., JR.; CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. *et al.* Structure and genetic variability of envelope glycoproteins of two antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus. *Journal of Virology*, v. 65, n. 11, p. 5744-5750, 1991.
- LACERENZA, D.; GENOVESE, F.; PROFITI, M. *et al.* Characterization of an immunodominant epitope of small ruminant lentivirus (srlv) nucleoprotein. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 125, n. 3-4, p. 361-367, 2008.
- LACERENZA, D.; GIAMMARIOLI, M.; GREGO, E. *et al.* Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 125, n. 3-4, p. 361-367, 2008., v. 112, n. 3-4, p. 267-271, 2006.
- LEITE, B. L. S.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R. *et al.* Avaliação da taxa de ocorrência da artrite-encefalite caprina vírus pelas regionais do escritório de defesa agropecuária do estado de são paulo, brasil, e seu mapeamento por meio de sistema de informações geográficas. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 71, n. 1, p. 21-26, 2004.
- LEROUX, C.; CHASTANG, J.; GREENLAND, T. *et al.* Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: Existence of heterogeneous populations in sheep and of the same lentiviral genotypes in sheep and goats. *Archives of Virology*, v. 142, n. 6, p. 1125-1137, 1997.
- LIMA, P. P.; ROCHA, M. A.; STANCEK, D. *et al.* Vírus da artrite encefalite caprina: Isolamento e caracterização de parte do gene gag. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n. 2, p. 135-142, 2004.
- MAMMANO, F.; OHAGEN, A.; HÖGLUND, S. *et al.* Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *Journal of Virology*, v. 68, n. 8, p. 4927-4936, 1994.
- MORDASINI, F.; VOGT, H.-R.; ZAHNO, M.-L. *et al.* Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *Journal of clinical microbiology*, v. 44, n. 3, p. 981-991, 2006.
- OLECH, M.; RACHID, A.; CROISE, B. *et al.* Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in poland. *Virus Research*, v. 163, n. 2, p. 528-536, 2012.
- PASICK, J. Maedi-visna virus and caprine arthritis-encephalitis virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. *Canadian journal Of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, v. 62, n. 4, p. 241-244, 1998.
- PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J. *et al.* Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (srlvs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, v. 35, n. 3, p. 257-274, 2004.
- PISONI, G.; BERTONI, G.; BOETTCHER, P. *et al.* Phylogenetic analysis of the gag region encoding the matrix protein of small ruminant lentiviruses: Comparative analysis and molecular epidemiological applications. *Virus Research*, v. 116, n. 1-2, p. 159-167, 2006.

- PISONI, G.; BERTONI, G.; PURICELLI, M. *et al.* Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *Journal of Virology*, v. 81, n. 10, p. 4948-4955, 2007.
- PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype b1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology*, v. 339, n. 2, p. 147-152, 2005.
- RAVAZZOLO, A. P.; REISCHAK, D.; PETERHANS, E. *et al.* Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses from southern brazil. *Virus Research*, v. 79, n. 1-2, p. 117-123, 2001.
- REINA, R.; BERTOLOTTI, L.; DEI GIUDICI, S. *et al.* Small ruminant lentivirus genotype e is widespread in sarda goat. *Veterinary Microbiology*, v. 144., n. 1-2, p. 24-31, 2011.
- REINA, R.; MORA, M. I.; GLARIA, I. *et al.* Molecular characterization and phylogenetic study of maedi visna and caprine arthritis encephalitis viral sequences in sheep and goats from spain. *Virus Research*, v. 121, n. 2, p. 189-198, 2006.
- ROSATI, S.; MANNELLI, A.; MERLO, T. *et al.* Characterization of the immunodominant cross-reacting epitope of visna maedi virus and caprine arthritis-encephalitis virus capsid antigen. *Virus Research*, v. 61, n. 2, p. 177-183, 1999.
- ROSATI, S.; PROFITI, M.; GREGO, E. *et al.* Antigenic variability of ovine lentivirus isolated in italy. *Veterinary Research Communications*, v. 28 Suppl 1, p. 319-322, 2004.
- SAITOU, N.; NEI, M. T. Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SALTARELLI, M.; QUERAT, G.; KONINGS, D. A. *et al.* Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of caev which generate infectious virus. *Virology*, v. 179, n. 1, p. 347-364, 1990.
- SALTARELLI, M. J.; SCHOBORG, R.; PAVLAKIS, G. N. *et al.* Identification of the caprine arthritis encephalitis virus rev protein and its cis-acting rev-responsive element. *Virology*, v. 199, n. 1, p. 47-55, 1994.
- SANTRY, L. A.; DE JONG, J.; GOLD, A. C. *et al.* Genetic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in naturally infected sheep and goats in ontario, canada. *Virus Research*, n. 0, 2013.
- SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J. B. *et al.* 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*, v. 319, n. 1, p. 12-26, 2004.
- SILVA, J. G.; ARAÚJO, P. B.; SOUZA, W. M. A. *et al.* Soroprevalência de lentivirus em caprinos leiteiros. *Medicina Veterinária, Recife*, v. 6, n. 3, p. 9-12, 2012.
- SKRABAN, R.; MATTHÍASDÓTTIR, S.; TORSTEINSDÓTTIR, S. *et al.* Naturally occurring mutations within 39 amino acids in the envelope glycoprotein of maedi-visna virus alter the neutralization phenotype. *Journal of Virology*, v. 73, n. 10, p. 8064-8072, 1999.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- VALAS, S.; BENOIT, C.; BAUDRY, C. *et al.* Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 6178-6185, 2000.

VALAS, S.; BENOIT, C.; GUIONAUD, C. *et al.*
North american and french caprine arthritis-
encephalitis viruses emerge from ovine maedi-
visna viruses. *Virology*, v. 237, n. 2, p. 307-318,
1997.

VALAS, S.; LE VEN, A.; CROISE, B. *et al.*
Interference of vaccination against bluetongue
virus serotypes 1 and 8 with serological
diagnosis of small-ruminant lentivirus infection.

CAPÍTULO 3

Caracterização antigênica de Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPR) por ELISA recombinante (MA/CA e SU) em rebanhos de caprinos e ovinos brasileiros

RESUMO

A resposta antigênica de soros de caprinos (n=1.882) e ovinos (n=67), oriundos de rebanhos do Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, foi avaliada frente aos antígenos recombinantes multiepítotos (SU1/SU5 e SU1/GAG/SU5) baseados nos genes *gag* (MA/CA) e *env* (SU) dos vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e Maedi-visna (MVV), objetivando a caracterização antigênica de amostras brasileiras de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR). A classificação antigênica dos soros de caprinos foi de 94,9% subtipo B1, 1% subtipo A13 e 4,1% indeterminado, enquanto os soros de ovinos foram um do subtipo A13 e três do subtipo B1. Os subtipos B1 e A13 foram identificados em ambas as espécies sugerindo que a transmissão interespecie de CAEV e MVV tem ocorrido nos rebanhos de caprinos e ovinos do Brasil. Alguns soros apresentaram resposta imune simultânea para os antígenos recombinantes SSB1 e SS0016, revelando uma reação antigênica cruzada ou ainda a possibilidade de coinfeção ou recombinação viral. ELISA recombinantes SSB1 e SGS foram apropriados para a caracterização antigênica e o diagnóstico dos LVPR no Brasil. A identificação de estirpes virais circulantes no Brasil utilizando proteínas recombinantes SS e SGS, inclusive com outros subtipos, poderá contribuir em estudos epidemiológicos para controle dos LVPR nos rebanhos.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da artrite-encefalite caprina (CAEV) e vírus Maedi-visna (MVV) são lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) e causam uma doença progressiva e debilitante em caprinos e ovinos (Adams *et al.*, 1983; Leroux *et al.*,

2010). Ambos são lentivirus patogênicos da família Retroviridae e estão distribuídos mundialmente acarretando perdas econômicas (Peterhans *et al.*, 2004). Os vírus têm como principais rotas de transmissão a ingestão de leite ou colostro infectado por inalação de secreções respiratórias (Peterhans *et al.*, 2004; Blacklaws, 2012). O diagnóstico de LVPR preconizado pela OIE (Organização Mundial para Saúde Animal) consiste dos testes de imunodifusão em gel de Agar (IDGA) e ELISA (Ensaio imunoenzimático), sendo que no Brasil o teste IDGA oficial pelo Ministério da Agricultura (MAPA, 2009; OIE, 2013).

Os métodos de diagnóstico sorológico usam como antígeno proteínas nativas do vírus, proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos para identificar a resposta humoral contra os LVPR (Adams *et al.*, 1985; Herrmann *et al.*, 2003; Herrmann-Hoesing, 2010). As proteínas estruturais *env* e *gag* dos LVPR são os principais alvos da resposta imune humoral e têm sido selecionadas como antígenos para o diagnóstico (Gogolewski *et al.*, 1985). A resposta humoral direcionada às proteínas da matriz (MA) e capsídeo (CA) (MA/CA) é mais precoce que para as glicoproteínas de *env* (Lacerenza *et al.*, 2006), mas ao contrário da resposta para MA/CA, os níveis de anticorpos direcionados para as glicoproteínas de *env* permanecem por mais tempo (Brinkhof e van Maanen, 2007; Blacklaws, 2012). Antígenos compostos pela combinação de proteínas de *gag* e *env* têm permitido maior sensibilidade diagnóstica, devido à resposta simultânea para ambas as proteínas (Brinkhof e van Maanen, 2007).

Estudos têm mostrado que CAEV e MVV são antigenicamente relacionados, com epítomos imunologicamente comuns dentro de todas as principais proteínas estruturais (Gogolewski *et al.*, 1985), entretanto, estudos recentes demonstraram que epítomos imunodominantes nas proteínas MA/CA, tanto quanto os domínios imunodominantes da glicoproteína de superfície (SU) do envelope apresentam resposta imune tipo-específica (Rosati *et al.*, 2004; Grego *et al.*, 2005; Lacerenza *et al.*, 2006). Antígenos construídos com epítomos imunodominantes da região amino-terminal da proteína SU de CAEV (aa 1 a 14, domínio SU1) induzem uma resposta tipo específica, uma vez que difere cerca de 50% na sequência de aminoácidos de MVV (Valas *et al.*, 2000; Bertolotti *et al.*, 2013). Em contraste, antígenos constituídos da região carboxi-terminal da proteína SU (aa 51 a 525, domínio SU5) podem ser usadas para detecção de todos LVPR, pois diferem apenas um aminoácido entre os dois lentivirus (Bertoni *et al.*, 2000; Valas *et al.*, 2000). Tais peptídeos sintéticos imunodominantes podem ser utilizados para caracterização genotípica de LVPR em caprinos e ovinos (Valas *et al.*, 2000; Mordasini *et al.*, 2006; Rachid *et al.*, 2013). Adicionalmente, antígenos constituídos dos domínios CA/MA fusionados e peptídeos SU5 detectam infecção em estágios iniciais (Lacerenza *et al.*, 2006; Carozza *et al.*, 2009) e tem maior sensibilidade diagnóstica devido à combinação dos domínios imunodominantes dos genes *env* e *gag*.

Os LVPR eram considerados patógenos espécie-específicos, com os grupos A e B associados aos ovinos e caprinos, respectivamente. Atualmente, há relatos da infecção cruzada interespecies de vírus dos grupos A e B de caprinos para ovinos ou vice-versa, e a transmissão horizontal pode ocorrer naturalmente (Zanoni, 1998; Shah *et al.*, 2004a; Pisoni *et al.*, 2005; Reina *et al.*, 2006; Gjerset *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 2010). Estudos recentes têm classificado

filogeneticamente os LVPR em cinco grupos principais e seus subtipos, dentre os quais, A (A1 a A13), B (B1 a B3), C, D, E (E1 e E2) (Bertolotti *et al.*, 2011; Giammarioli *et al.*, 2011; Reina *et al.*, 2011). A observação de que alguns subtipos de LVPR são encontrados em caprinos e ovinos sugere que a transmissão interespecies ocorreu anteriormente em várias ocasiões (Shah *et al.*, 2004b). A transmissão interespecies pode influenciar a biologia da infecção por LVPR, incluindo patogenicidade, transmissão viral e diagnóstico (Rachid *et al.*, 2013)

No Brasil, a produção consorciada de caprinos e ovinos atrelada aos sistemas de manejo é favorável à transmissão dos LVPR interespecies (Bandeira *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Martins e Lilenbaum, 2011; Sardi *et al.*, 2012). Já há relato de infecção por Maedi Visna em caprino naturalmente infectado no estado de Pernambuco (Castro *et al.*, 1999b). Considerando a possibilidade de transmissão dos MVV e CAEV interespecies de pequenos ruminantes do Brasil e as suas consequências agregadas, um estudo de caracterização antigênica de LVPR entre as principais regiões criadoras dessas espécies seria de grande relevância para epidemiologia da infecção.

Este trabalho tem objetivo de avaliar a resposta antigênica de caprinos e ovinos, oriundos de rebanhos do nordeste, sudeste e sul do Brasil, aos antígenos recombinantes multiepítomos baseados nos genes *gag* (MA/CA) e *env* (SU1/SU5) de CAEV e MVV para a caracterização antigênica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Entre os anos de 2009 e 2011 amostras de sangue de caprinos (n=1882) foram coletadas por venopunção em tubo a vácuo sem anticoagulante, provenientes de 35 propriedades distribuídas nas regiões sudeste (n=611: RJ, MG e SP), nordeste (n=1176:

RN, PB, BA, MA, CE e PI) e Sul (n=95, SC) do Brasil. Além de 67 ovinos de raça Santa Inês oriundos do nordeste (PI e MA) do Brasil. Os caprinos tinham idades acima de seis meses e distribuídos dentre as raças Alpino-americano, Anglo-nubiano, Boer, British alpina, Canindé, Pardo-alpino, Saanen, Toggenburg, SRD.

2.2 Imunodifusão em gel de agarose (IDGA)

As amostras de soros (n=1882) foram testadas para detecção de anticorpos anti-p28 e gp135 do vírus da artrite encefalite caprina por IDGA usando teste comercial (Kit IDGA-CAE, Biovetech, PE, Brasil). Seguindo as recomendações do fabricante, foram utilizados 10 µL de controle positivo/antígeno e 30 µL soro, aplicados em gel de agarose a 1,1% em tampão borato pH 8,6. A leitura dos testes foi realizada em luz indireta sobre fundo escuro.

2.3 Antígenos recombinantes SU1/GAG/SU5 e SU1/SU5

No teste de ELISA foi usado um conjunto de antígenos baseados em um recombinante multiepítomos de *gag* e/ou *env* (Olech *et al.*, 2012). O antígeno SGS (SU1/GAG/SU5) contém os precursores das proteínas MA/CA do gene *gag* (p16-p25) fusionados as regiões terminais dos domínios imunodominantes SU1 (aa 84 -143) e SU5 (aa 590 - 625) da

glicoproteína de superfície (SU). O antígeno SS (SU1/SU5) contém apenas os epítomos de SU e foi derivado do anterior (SU1/Gag/SU5) pela remoção da região completa de *gag* (Figura 1). Cada conjunto de antígeno foi estabelecido a partir das sequências de cepas CAEV (isolados Fr680 e Fr3056) e MVV (isolado 0016), que pertencem ao subtipo B1 e A13, respectivamente (Olech *et al.*, 2012). Os antígenos recombinantes foram desenvolvidos no laboratório ANSES – Niort, França, laboratório de referência da OIE para diagnóstico de LVPR.

2.4 ELISAS recombinantes e ELISA Chekit

Um total de 1882 soros de caprinos oriundos da região Sudeste, Nordeste e Sul do Brasil foram testados contra as proteínas recombinantes SSB1 e SS0016 (Olech *et al.*, 2012). Os soros com resultados discordantes entre IDGA e proteínas recombinantes SS foram testados com as proteínas recombinantes SGS (Tabela 1). Todos os soros de ovinos foram testados com as quatro proteínas recombinantes SS e SGS (SS e SGS 0016, SS e SGS-B1) (Tabela 1). Os resultados discordantes entre Elisa recombinante (SS ou SGS) e IDGA foram testados com o kit CHEKIT CAEV/MVV Bommeli – Idexx (Tabela 1).

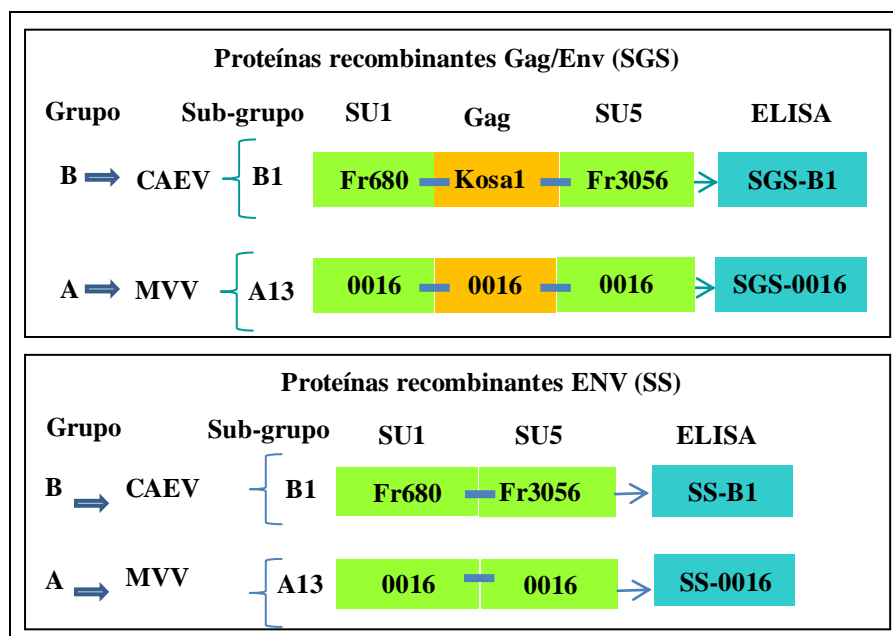


Figura 1. Antígenos recombinantes SGS e SS. O antígeno SGS B1 é constituído pela sequência SU1 da cepa viral 680 (Valas *et al.*, 1997), da sequência *gag* de cepa viral polonesa Kosal1 e da sequência SU5 da cepa viral francesa 3056 (Germain e Valas, 2006). O antígeno SGS A13 compreende as sequências da cepa polonesa 0016 de SU1, SU5 e *gag*. O antígeno SS exprime unicamente os domínios SU1 e SU5 e foram gerados pela eliminação do domínio de *gag* a partir de uma digestão enzimática (Olech *et al.*, 2012).

Tabela1. Descrição de soros de caprinos e ovinos e respectivos testes diagnósticos realizados

	Teste	Soros	Testado/ELISA
Caprino	ELISA SSB1, ELISA SS0016 e IDGA	1882	-
	ELISA SS ≠ IDGA	1198 e 75	SGS (B1 e 0016)
	ELISA SS ou SGS ≠ IDGA	294	CHEKIT
Ovino	ELISA SS e SGS (0016 e B1)	67	-

Legenda: discordante, ≠, IDGA, imunodifusão em gel de agar; proteínas recombinantes, SS e SGS; (-), não realizado.

2.5 Caracterização antigênica de soros de caprinos e ovinos por ELISA SSB1 e SS0016

Um total de 1882 soros de caprinos e 67 soros de ovinos com as proteínas recombinantes SSB1 e SS0016 para sorotipagem em CAEV e MVV foram testados (Tabela 1).

2.6 Técnica de ELISA com proteínas recombinantes

A proteína recombinante foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6) (Carbonate-Bicarbonate buffer, Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 5 µg/mL seguido da adsorção (100 µL/poço) em placas de ELISA (Maxisorp Immunoplate, Nunc, Thermo Fischer Scientific) por aproximadamente 16 h a 4°C. A placa foi lavada quatro vezes com 300 µL

de PBS 1X Tween-20 (PBST) 0,05% (v:v), e adicionado 200 µL de solução de bloqueio na concentração 1X (10X blocking buffer (casein-based buffer), Sigma-Aldric) e incubada por 1h sob agitação moderada a 37°C. As placas foram lavadas quatro vezes com 300 µL de PBST antes de adicionar 100µL dos soros de ovino ou caprino diluído (1:100) em solução de bloqueio e incubada por 1 h a 37°C. Posteriormente foram lavadas quatro vezes com 300 µL de PBST. Distribuiu-se em seguida, 100 µL de anticorpo secundário anti-caprino/ovino - IgG (Monoclonal Anti-Goat/Sheep IgG, Clone GT-34, Peroxidase Conjugate, Purified Mouse Immunoglobulin, Sigma-Aldrich), diluído 1:1000 em solução de bloqueio, e incubou-se por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas mais quatro vezes com 300 µL de PBST e duas vezes com 300 µL de PBS 1X. Adicionou-se 100 microlitros de substrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, Sigma-Aldrich) em tampão fosfato - citrato 0,05M (pH 4) contendo 0,01% (v:v) de peróxido de hidrogênio (0,5 mg/mL). Seguiu-se um período de incubação (15 min a 21°C) e a reação foi parada pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 1N. A densidade ótica (DO) foi lida à 405nm em leitor de ELISA (Multiskan Ascent, Thermo Scientific). Todas as lavagens foram realizadas em lavador automático de placas (ASYS Atlantis, Biochrom). O ponto de corte de DO 0,400 com especificidade de 100%, foi previamente estabelecido (Olech *et al.*, 2012).

2.7 ELISA Chekit CAEV/MVV Screening

ELISA Chekit CAEV/VMV Screening monophasic Bomelli (Laboratoires IDEXX, Bern, Suíça) é um kit de ELISA indireto contendo o vírus total do CAEV. Na execução do ELISA Chekit, a primeira etapa consiste em pré-diluir os soros dos animais e os controles positivos e negativo em 1:10 com solução de diluição em uma placa (Venosafe 10 mL Ref. VF-109 SP, Terumo).

Após incubação por 30 min a 18-26°C, 100 µL de cada amostra e os controles foram transferidos para placa de ELISA sensibilizada com antígeno viral. Seguiu-se incubação por 90 min a 18-26°C, depois os poços foram lavados três vezes com 300 µL de solução de lavagem. Cem microlitros de conjugado CAEV/VMV- Anti-IgG-ruminante marcado com peroxidase foram distribuídos e incubados por 90 min a 18-26°C. A placa foi lavada três vezes com 300 µL de solução de lavagem, adicionado 100 µL de substrato TMB e em seguida incubadas por 15 min a 18-26°C sob abrigo de luminosidade. Cem microlitros de solução stop foram distribuídas nos poços e em seguida a densidade óptica foi estimada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Thermo Electron Corporation) a um comprimento de onda de 450nm. As amostras foram classificadas como positivas ou negativas de acordo com a relação de limites recomendada pelo fabricante. Todas as lavagens foram realizadas em lavador automático de placas (ASYS Atlantis, Biochrom) e a cada etapa de incubação a placa era recoberta por um filme adesivo.

2.8 Análise estatística

Os dados foram tratados em programa Microsoft Excel e a frequência e a tabela de contingência 2x2 foram computadas utilizando o programa Statistica

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização antigênica de soros de caprino e de ovinos por ELISA de proteínas recombinantes SSB1 e SS0016

3.1.1 Caprinos

Para avaliar a resposta antigênica de soros de caprinos de rebanhos brasileiros, os soros foram testados com as proteínas recombinantes SSB1 e SS0016, objetivando a identificação antigênica correspondente aos genótipos B (CAEV) e A (MVV),

respectivamente. Os soros dos caprinos foram classificados em sua maioria como grupo B, subtipo B1 (CAEV) (Gráfico 1). Em 1.882 soros testados em ELISA recombinante, 36,3% (683/1.882) e 4,4% (82/1.882) reagiram positivamente às proteínas SSB1 e SS0016, respectivamente (Tabela 2). Entretanto, 3,7% (70/1.882) foram positivos para ambas proteínas. Dez soros reagiram exclusivamente à proteína SS0016, dentre os quais, cinco foram negativos na proteína SGS0016 e cinco soros confirmaram a positividade na proteína SGS0016 (Tabela 4). Os soros que reagiram para as proteínas SSB1 e SS0016, mas com DO maior no antígeno SS0016, e não próximas entre elas, foram considerados como grupo A (n = 2, Tabela 5). Enquanto aqueles com densidade mais intensa em SSB1 (n = 40) foram classificados no grupo B (Tabela 5). Soros com reatividades semelhantes (n=28) em ambas as proteínas SSB1 e SS0016 foram considerados grupo A/B (Tabelas 4 e 5). A classificação antigênica de todos os soros confirmados como positivos para as proteínas SSB1 e SS0016 (n=688) estão apresentados na Tabela 3. Os caprinos identificados com o subtipo A13 (MVV) eram oriundos de seis rebanhos localizados nos estados da Bahia (n=3, rebanhos diferentes), Maranhão (n=2, mesmo rebanho), Ceará (n=1), Piauí (n=1) (Tabela 4).

Resultados dos soros reagentes para as proteínas SSB1 e/ou SS0016 em relação a proteínas SGS e IDGA foram avaliados. Os soros com resultados negativos em SSB1 (n = 1.199) foram testados em SGS-B1 obtendo 15,9% (190/1.198) de positivos, além de um soro positivo em SGS0016 (Tabela 2). Dentre 673 soros de caprinos positivos em IDGA apenas 78% (525/673) foram positivos em ELISA SSB1 e 7% positivos

em ELISA SS0016. Enquanto entre os 1209 soros negativos em IDGA, 13% (157/1.209) foram positivos em ELISA SSB1 e 3% (36/1.209) positivos em ELISA SS0016.

3.1.2 Ovinos

Dentre os 67 soros de ovinos testados pelo ELISA recombinante, cinco foram positivos nos antígenos recombinantes SSB1 e dois positivos em SS0016. Dentre os dois soros positivos em SS0016, um caprino (nº. 666) foi positivo para SSB1 e negativo para SGS0016. Dos cinco animais positivos no antígeno recombinante SSB1, dois foram negativos para SGSB. Cinco soros reagiram com a proteína recombinante SGSB1. A classificação antigênica dos ovinos foi: um ovino incluído no grupo A, subtipo A13 (ovino nº 628) e três no grupo B, subtipo B1 (ovinos nºs: 200, 198 e 666).

3.2 Caracterização molecular versus caracterização antigênica

Vinte e sete caprinos e dois ovinos tiveram os genes *gag* (CA/MA) e *env* (V1/V2 e V4/V5) sequenciados no estudo prévio, e a análise genética e a dedução de aminoácidos foram estabelecidas. A caracterização genética em genótipos de LVPR foi similar à classificação obtida com a resposta antigênica identificada nos antígenos SSB1 e SS0016, com exceção de dois caprinos (Br195 e Br1163) (Tabela 6). Ambos foram caracterizados pelo sequenciamento do gene *gag* como genótipo A, enquanto que, na análise de aminoácidos na região V4 da proteína SU no gene *env*, apresentou-se como genótipo B (Br195) ou a inserção de aminoácidos na região V4 do gene *env* da SU (Br1163). A amostra Br1163 teve classificação antigênica indeterminada, enquanto Br195 apresentou resposta antigênica para o grupo B.

Tabela 2. Resultados sorológicos de proteínas recombinantes SS e SGS obtidos em caprinos de rebanhos brasileiros

ELISA	Positivo	Negativo	Total
SS B1	683	1.199	1.882
SS 0016	82	1.800	1.882
SS B1/SS 0016	70	1.812	1.882
SGS B1	190	1.008	1.198
SGS 0016	11	64	75

Notas: SSB1, antígeno grupo B específico; SS0016, antígeno grupo A - específico

Tabela 3. Classificação antigênica de LVPR de caprinos de rebanhos brasileiros obtidos na proteína recombinante SS.

Grupo/subtipo	Caprinos	%
B1	653	94,9
A13	7	1,0
A/B	28	4,1
TOTAL	688	100

Nota: A/B = indeterminado

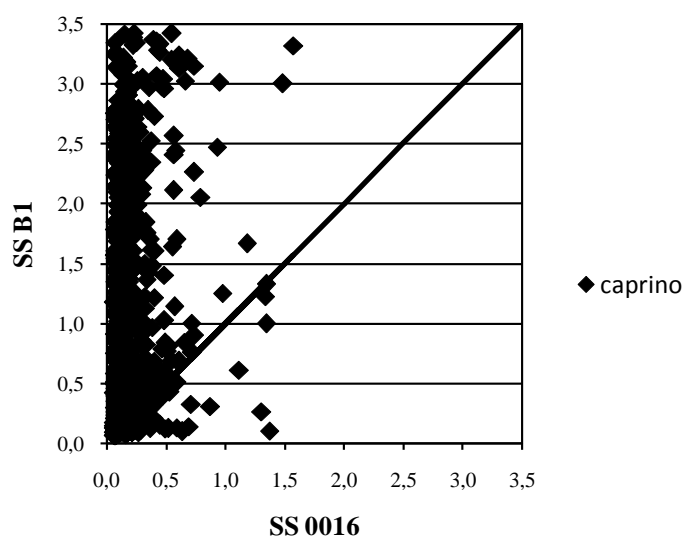


Figura 2. Reatividade em ELISA SSB1* e SS0016** de soros de caprinos oriundos das regiões NE, SE e S do Brasil. Os soros de caprinos foram em sua maioria positivos para o antígeno recombinante SSB1 e classificados antigenicamente no subtipo B1 de LVPR. Treze soros se localizaram no eixo da abscissa, pois reagiram exclusivamente para o antígeno SS0016 e/ou apresentara alta DO, alguns dos quais foram confirmados na classificação antigênica de MVV, subtipo A13. SS0016. *SSB = antígeno tipo - B específico, **SS0016 = antígeno tipo - A específico.

Tabela 4. Soro caprinos que obtiveram reação antigênica exclusivamente para o antígeno SS0016 ou que apresentaram DO elevada em ELISA SSB1 e SS0016

	Raça	Sexo	Região	Estado	Rebanho	Cidade	Caprino/Ovino Rebanhos	IDGA	ELISA (DO)				Grupo/ LVPR
									SGSB1	SGS0016	SSB1	SS0016	
1	Saanen	F	NE	BA	1	F. de Santana	Não	+	0,352	0,756	0,142	0,691	A
2	A. nubiano	F	NE	PI	2	União	Sim	+	0,110	0,430	0,129	0,521	A
3	A. nubiano	M	NE	CE	3	Aracoiaba	Não	-	NR	0,426	0,327	0,710	A
4	A. nubiano	F	NE	BA	4	Itatin	Sim	-	0,097	0,624	0,267	1,305	A
5	SI	SI	NE	MA	5	V. Grande	Sim	-	NR	0,956	0,105	1,370	A
6	A. nubiano	F	NE	CE	3	Aracoiaba	Não	-	0,210	0,186	0,152	0,446	Não
7	A. nubiano	F	NE	BA	4	Itatin	SI	-	NR	0,286	0,311	0,870	Não
8	A. nubiano	F	NE	BA	4	Itatin	SI	-	0,106	0,277	0,122	0,492	Não
9	Bôer	F	S	SC	6	Chapecó	Não	-	0,081	0,282	0,101	0,639	Não
10	SI	SI	NE	MA	5	V. Grande	Sim	-	NR	0,372	0,133	0,588	Não
11	A. nubiano	F	NE	PI	2	União	Sim	-	NR	0,832	0,612	1,115	A
12*	A. nubiano	F	NE	PB	7	Soledade	Sim	+	NR	NR	1,226	1,335	A/B
13	Saanen	F	NE	BA	8	St.Ant.Jesus	Sim	+	NR	NR	1,326	1,343	A/B
14	Saanen	F	NE	BA	8	St.Ant.Jesus	Sim	-	NR	NR	1,001	1,346	A

Nota: Descrição de raça, sexo, região, estado, rebanho, informação se o rebanho é misto, resultado de IDGA e ELISAs recombinantes e classificação antigênica de LVPR. Números 1 a 5: confirmado com ELISA SGS0016 a classificação do grupo A; números 6 a 10: soros com reatividade em SSO016, mas negativos em SGS 0016 (não classificados); números 11 a 14: soros positivos com ambas proteínas e com reatividade maior em SS0016 (grupo indeterminado). As densidades óticas (D.O.) destacadas em negrito são positivas (ponto de corte = 0,400). SI= sem informação; NR = Não realizado, S = Sul, NE = Nordeste, SE = Sudeste SS0016 = antígeno tipo - A específico e SSB1 = antígeno tipo - B específico. * caprino n°. 12 = Br1163, amostra sequenciada.

Tabela 5. Soros de caprinos (n=70) com reatividade simultânea nas proteínas recombinantes SSB1* e SS0016** e a classificação antigênica de acordo com os critérios estabelecidos.

Caprino	Estado	ELISA LVPR			Caprino	Estado	ELISA LVPR		
		SSB1	SS0016	Grupo			SSB1	SS0016	Grupo
9090	MG	1,667	1,182	B	8987-47	MG	0,687	0,605	A/B
2122	MG	3,264	0,446	B	1163	PB	1,226	1,335	A/B
2060	MG	2,442	0,581	B	9007	RJ	0,512	0,590	A/B
5046	MG	2,410	0,567	B	9010	RJ	0,774	0,507	A/B
6084	MG	0,840	0,492	B	9092-16	MA	0,486	0,501	A/B
7119	MG	3,033	0,477	B	3	CE	0,489	0,418	A/B
7114	MG	1,026	0,485	B	10	CE	0,448	0,414	A/B
3375	MG	2,973	0,462	B	9006	BA	0,400	0,473	A/B
5502	MG	2,730	0,400	B	08023	BA	1,326	1,343	A/B
6535	MG	3,419	0,549	B	9045	MG	0,691	0,547	A/B
6584	MG	1,701	0,591	B	9047	MG	0,519	0,478	A/B
6601	MG	3,147	0,737	B	9081	MG	0,491	0,423	A/B
7685	MG	2,262	0,736	B	9116	MG	0,902	0,738	A/B
7698	MG	3,203	0,685	B	8785	MG	0,680	0,599	A/B
0312	RJ	3,281	0,426	B	8	PB	0,757	0,717	A/B
77	RJ	2,054	0,790	B	19124/11007	PI	0,545	0,402	A/B
7313	SP	3,020	0,661	B	2	CE	0,470	0,415	A/B
4218	SP	3,196	0,546	B	9	CE	0,845	0,654	A/B
356	SP	3,347	0,421	B	11	CE	0,465	0,419	A/B
7091/71	MA	1,404	0,485	B	8010	BA	0,499	0,469	A/B
77	MA	2,469	0,932	B	0162	BA	0,403	0,401	A/B
93	MA	1,640	0,554	B	7	SC	0,605	0,428	A/B
U.grande	PI	1,217	0,403	B	53	SC	0,506	0,417	A/B
09041	PI	2,999	1,484	B	533	PI	0,428	0,529	A/B
9019	CE	3,013	0,947	B	821	PI	0,600	0,484	A/B
5221	CE	3,230	0,613	B	19	RN	0,516	0,474	A/B
Formiga	CE	2,566	0,566	B	7047	CE	0,503	0,468	A/B
8025	CE	3,066	0,423	B	08034	MA	0,519	0,481	A/B
166	BA	1,140	0,573	B					
5002	BA	2,112	0,560	B					
9024	BA	1,253	0,975	B	7058	PI	0,612	1,115	A
09025	BA	3,331	0,445	B	07065	BA	1,001	1,346	A
32	PB	0,789	0,465	B					
4	PB	0,678	0,402	B					
24	RJ	3,315	1,573	B					
90	RJ	0,813	0,523	B					
72	SP	3,131	0,610	B					
72	MA	1,605	0,405	B					
3005	BA	1,003	0,715	B					
10005	CE	2,959	0,485	B					

Notas: grupo A: soros apresentando DO com maior intensidade em SS0016; grupo B: soros apresentando DO com maior intensidade em SSB1; indeterminado (A/B) = soros com reatividades próximas em SSB1 e SS0016. DO = densidade ótica; * SSB1 = antígeno tipo - B específico, **SS0016 = antígeno tipo - A específico.

Tabela 6. Classificação genética obtida no gene *env* (V1/V2 e V4/V5) e *gag* (MA/CA) e antigênica (SU1/SU5) de caprinos e ovinos naturalmente infectados com LVPR no Brasil.

Espécie	n°	Animal	Raça	Espécime	Caprino/ Ovino	Rebanho		Subtipo/Análise Filogenética			ELISA D.O/ Subtipo			
						Rebanho	Estado	V1V2	V4V5	MA/CA	SSB1	SS0016	Subtipo	
1	Caprino	Br51	05C-RN/09	Toggenburg	MSC	Não	1	RN	NR	B1	NR	3,190	0,158	B1
2	Caprino	Br53	06C-RN/09	Toggenburg	MSC	Não	1	RN	B1	NR	B1	0,964	0,091	B1
3	Caprino	Br150	14D-MG/10	Saanen	PBMC	Não	2	MG	B1	B1	B1	1,420	0,173	B1
4	Caprino	Br168	17E-MG/10	Toggenburg	PC	Não	3	MG	B1	B1	B1	2,523	0,372	B1
5	Caprino	Br272	18E-MG/10	Toggenburg	PC	Não	3	MG	NR	NR	B1	0,800	0,132	B1
6	Caprino	Br185	19F-MG/10	Saanen	MSC	Não	4	MG	NR	NR	B1	3,599	0,093	B1
7	Caprino	Br195	21G-MG/10	Saanen	MSC	Sim	5	MG	NR	B1	A13	0,994	0,335	B1
8	Caprino	Br286	23G-MG/10	Saanen	LBA	Sim	5	MG	NR	B1	NR	1,026	0,485	B1
9	Caprino	Br329	24H-PB/10	British alpino	PC	Sim	6	PB	B1	B1	NR	0,918	0,089	B1
10	Caprino	Br387	28L-RJ/10	Saanen	MSC	Não	7	RJ	B1	B1	B1	1,321	0,125	B1
11	Caprino	Br425	30M-RJ/10	Saanen	MSC	Não	8	RJ	B1	B1	B1	1,846	0,329	B1
12	Caprino	Br423	31N-RJ/10	Saanen	MSC	Não	9	RJ	B1	B1	NR	3,655	0,077	B1
13	Caprino	Br497	32N-RJ/10	P. alpino	MSC	Não	9	RJ	NR	NR	B1	2,749	0,072	B1
14	Caprino	Br491	37P-SP/10	Saanen	MSC	Não	10	SP	NR	B1	B1	1,980	0,094	B1
15	Caprino	Br638	40R-MA/11	A. nubiano	LBA	Não	12	MA	B1	NR	NR	1,608	0,227	B1
16	Caprino	Br607	41S-MA/11	A. nubiano	MSC	Sim	13	MA	B1	NR	B1	1,040	0,190	B1
17	Caprino	Br634	42T-MA/11	Boer	PBMC	Sim	14	MA	B1	B1	B1	0,236	0,201	B1
18	Caprino	Br727	48Y-CE/11	A. nubiano	PC	Sim	18	CE	NR	NR	B1	0,272	0,182	B1
19	Caprino	Br765	49K-BA/11	P. alpino	PC	Não	19	BA	NR	NR	B1	0,274	0,138	B1
20	Caprino	Br769	50X-BA/11	A. nubiano	PC	Sim	20	BA	B1	B1	NR	0,198	0,197	B1
21	Caprino	Br798	51Z-BA/11	Saanen	PC	Sim	21	BA	NR	NR	B1	2,524	0,189	B1
22	Caprino	Br849	BrPE1(01)	Saanen	MSC	SI	25	PE	NE	B1	A13	NR	NR	NR
23	Ovino	Br198	Santa inês	PBL	Sim	15	MA	B1	NR	B1	B1	3,971	0,134	B1
24	Ovino	Br200	Santa inês	PBL	Sim	15	MA	NR	NR	B1	B1	3,657	0,075	B1
25	Caprino	Br1163	A. nubiano	PBL	Sim	6	PB	NR	Mutação	A13	A13	1,226	1,335	A/B
26	Caprino	Br44	A. nubiano	PBL	Sim	26	PI	B1	NR	NR	NR	3,371	0,177	B1
27	Caprino	Br9007	A. nubiano	PBL	Sim	15	MA	B1	B1	NR	NR	3,371	0,078	B1
28	Caprino	Br7003	A. nubiano	PBL	Sim	15	MA	B1	B1	NR	NR	2,795	0,115	B1
29	Caprino	Br29	A. nubiano	PBL	SI	27	BA	B1	B1	NR	NR	1,508	0,247	B1
30	Caprino	Br81	Saanen	PBL	Não	28	RJ	B1	NR	NR	NR	3,971	0,134	B1

Nota: Dados sobre espécie, identificação do animal, raça, espécimes sequenciados (1 a 22: isolados de tecidos), informação se a propriedade cria ovino e caprino, propriedade, estado, amostras sequenciadas e respectivos domínios. Animais destacados em negrito têm caracterização genética diferente nos genes *gag* e *env*. Os animais com DO destacado em cinza foram positivos na proteína SGSB1. MSC = membrana sinovial caprina; PBMC= células mononucleares do sangue periférico

4. DISCUSSÃO

A análise da relação antigênica entre subtipos de LVPR usando antígenos recombinantes multiepítomos (SU1/GAG/SU5 e SU1/SU5) foi realizada em soros de caprinos (n=1882) e ovinos (n=67) oriundos de rebanhos brasileiros (regiões NE, SE e S).

Os soros foram testados em antígenos recombinantes SU1/SU5 (SSB1 e SS0016), e as respostas imunes contra estes antígenos foram detectadas em rebanhos brasileiros de caprinos e ovinos infectados com ambos os subtipos B1 e A13. Dentre os caprinos, sete (1%) e 653 (94,9%), foram caracterizados antigenicamente com os subtipos A13 e B1, respectivamente. Enquanto em ovinos, foi classificado um no subtipo A13 e três no subtipo B1. Os subtipos B1 e A13 são integrantes dos grupos B e A de LVPR, os quais têm como protótipo CAEV Cork e Maedi Visna (K1415), respectivamente (Shah *et al.*, 2004a; Olech *et al.*, 2012).

Castro *et al.* (1999) relatam terem identificado por caracterização molecular o MVV em um caprino do estado de Pernambuco. Neste presente estudo foram identificados por caracterização antigênica (SU1/SU5) sete caprinos positivos para MVV (subtipo A13) em quatro estados da região nordeste do Brasil (MA, CE, PI e BA), oriundos de seis diferentes propriedades. Três ovinos (nº. 200, 198 e 666), originários da mesma propriedade, foram identificados antigenicamente com o subtipo B1 e dos quais, dois foram sequenciados (Br200 e Br198), confirmando a classificação do subtipo B1. O relato deste subtipo viral ocorrendo em ovinos foi divulgado pela primeira vez na França por Germain e Valas (2006) e agora também identificado por este estudo no Brasil. Os subtipos A13 e B1 estão presentes nos rebanhos brasileiros em caprinos e ovinos, evidenciando que existe transmissão de CAEV e MVV interespecíes acontecendo

naturalmente no Brasil como relatado em outros países (Zanoni, 1998; Shah *et al.*, 2004a; Pisoni *et al.*, 2005; Reina *et al.*, 2006; Gjerset *et al.*, 2007; Leroux *et al.*, 2010), o qual pode ter ocorrido em várias ocasiões no passado (Shah *et al.*, 2004b). O contato próximo entre as espécies de ovinos e caprinos, em rebanhos consorciados, o que é comum no Brasil, combinado com as práticas de manejo, incluindo ingestão de colostro/leite de ovinos contaminado por cabritos e vice-versa, são fatores de risco contribuintes para a transmissão (Peterhans *et al.*, 2004; Gjerset *et al.*, 2007). Os rebanhos onde foram identificados os caprinos com subtipo A13 (n = 4) e ovinos B1 eram constituídos por rebanho consorciados. Embora estes fossem distribuídos em diferentes instalações, em algum momento (ex. feiras de exposições) houve um contato mais próximo, com compartilhamento do arraçoamento, de água, de equipamentos de tosquia e casqueamento. Além disso, em algumas propriedades incluídas neste estudo foram observados ovinos e caprinos compartilhando mesmo espaço nos sistemas de manejo. A transmissão entre estas espécies pode ter ocorrido em ambas as direções como previamente apresentado (Shah *et al.*, 2004b) e conseqüentemente, influenciado a biologia da infecção de LVPR, incluindo patogenicidade, transmissão viral e o diagnóstico (Rachid *et al.*, 2013).

Alguns soros apresentaram simultaneamente resposta imune para os antígenos recombinantes SSB1 e SS0016 (Tabela 5), revelando uma reação antigênica cruzada, suportada pelo fato de que frequentemente a reatividade foi proporcional em ambos. Antígenos derivados de cepas do genótipo A de LVPR têm maior capacidade para detectar reação cruzada de anticorpos nas infecções de genótipos B, e por conseqüência, não distinguem das infecções da LVPR tipo A e B (Lacerenza *et al.*, 2006; de Andrés *et al.*, 2013). Ainda que uma

confirmação pudesse ser estabelecida com as respectivas proteínas SU1/GAG/SU5 (SSGB1 e SSG0016), considerando o fato da maior sensibilidade desta quando comparada a antígenos contendo somente SU (Lacerenza *et al.*, 2006; Carrozza *et al.*, 2009; Olech *et al.*, 2012), não se pode excluir a possibilidade de coinfeção ou recombinação viral (Pisoni *et al.*, 2007), particularmente, com aqueles soros com forte resposta para ambos antígenos. Uma provável recombinação ou coinfeção foi observada no estudo de caracterização genética em três caprinos (Br195, Br1163 e Br849). Destaca-se entre estes o animal Br1163 (Tabela 6) que em análise do gene *gag* foi classificado como pertencente ao genótipo A, enquanto que, na dedução aminoácidos dos domínios V4/V5 (SU) apresentou inserção de um novo motivo na principal região imunogênica e altamente conformacional da glicoproteína de superfície (domínio V4) (Hotzel *et al.*, 2002). Este fato justificaria então, a dupla reatividade deste animal às proteínas *gag* e *env*, evidenciando a seleção ou pressão seletiva imunológica e a necessidade de variação antigênica do vírus para escapar da resposta imune do hospedeiro (Valas *et al.*, 2000).

De acordo com os resultados de caracterização filogenética, a maioria dos caprinos infectados são subtipos B1, o que leva a crer que o antígeno recombinante SSB1 é apropriado para detecção de infecções LVPR no Brasil (de Andrés *et al.*, 2013). No entanto, também foi demonstrado que alguns animais são infectados com LVPR do grupo A, que é altamente heterogêneo (13 subtipos identificados) (Shah *et al.*, 2004a) e sendo improvável que o antígeno SS0016 (subtipo A13) seja capaz de detectar anticorpos contra a infecção de MVV com todos estes subtipos. Então, é provável, que outras proteínas recombinantes representativas do grupo A sejam imprescindíveis para o diagnóstico de infecção LVPR no Brasil. Por outro lado,

cerca de 20% dos soros de caprinos foram positivos em IDGA e negativos em SSB1/SS0016, indicando que estas proteínas recombinantes não são capazes de detectar todas as infecções. No entanto, a utilização de proteínas SGS (SU1/GAG/SU5) fornece maior sensibilidade diagnóstica (Lacerenza *et al.*, 2006; Carrozza *et al.*, 2009; Olech *et al.*, 2012), o que pode ser evidenciado pelos resultados dos soros negativos obtidos em SSB1, onde 15,9% foram positivos para a proteína SGB1.

Neste estudo identificou-se a resposta antigênica contra os subtipos A13 e B1 de LVPR nas espécies de caprinos e ovinos de rebanhos brasileiros. ELISA recombinante (SS e SGS) pode ser uma ferramenta diagnóstica e de caracterização antigênica de LVPR no Brasil.

5 CONCLUSÕES

Nos rebanhos de caprinos e ovinos do Brasil foram identificados por caracterização antigênica os subtipos B1 e A13 de LVPR em ambas as espécies. Este cenário mostrou que a transmissão de CAEV e MVV interespecies de ovino e caprino tem ocorrido durante os sistemas de manejos, mas a criação consorciada destas espécies nas propriedades pode ser um fator de risco importante para a transmissão dos LVPR interespecies.

Os antígenos SSB1 e SGS são apropriados para a caracterização antigênica e o diagnóstico dos LVPR no Brasil. A identificação de cepas virais circulantes no Brasil utilizando proteínas recombinantes SS e SGS, inclusive com outros subtipos, pode contribuir para os levantamentos soro epidemiológicos objetivando o controle dos LVPR em rebanhos brasileiros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. S.; GOGOLEWSKI, R. P.; BARBET, A. F. *et al.* Identification of caprine arthritis-encephalitis retrovirus proteins in immunodiffusion precipitin lines. *The Journal of general virology*, v. 66 n. 5, p. 1139-1143, 1985.
- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L. *et al.* Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. *American Journal of Veterinary Research*, v. 44, n. 9, p. 1670-1675, 1983.
- BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O. *et al.* Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the cariri region, paraíba state, brazil. *Veterinary Journal*, v. 180, n. 3, p. 399-401, 2009.
- BERTOLOTTI, L.; MAZZEI, M.; PUGGIONI, G. *et al.* Characterization of new small ruminant lentivirus subtype b3 suggests animal trade within the mediterranean basin. *The Journal of General Virology*, v. 92 n. 8, p. 1923-1929., 2011.
- BERTOLOTTI, L.; REINA, R.; MAZZEI, M. *et al.* Small ruminant lentivirus genotype b and e interaction: Evidences on the role of roccaverano strain on reducing proviral load of the challenging caev strain. *Veterinary Microbiology*, v. 163, n. 1-2, p. 33-41, 2013.
- BERTONI, G.; HERTIG, C.; ZAHNO, M. L. *et al.* B-cell epitopes of the envelope glycoprotein of caprine arthritis-encephalitis virus and antibody response in infected goats. *The Journal of General Virology*, v. 81, n. Pt 12, p. 2929-2940, 2000.
- BLACKLAWS, B. A. Small ruminant lentiviruses: Immunopathogenesis of visna-maedi and caprine arthritis and encephalitis virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 35, n. 3, p. 259-269, 2012.
- BRASIL. *Manual de legislação: Programas nacionais de saúde animal do brasil*. Brasil, Brasília - DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária-SDA. Departamento de Saúde Animal - DSA, 2009. 440 p. Disponível em:http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Manual%20de%20Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Sa%C3%BAde%20Animal%20low.pdf. Acesso em: 09/11/2013.
- BRINKHOF, J.; VAN MAANEN, C. Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small ruminant lentiviruses. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 14, n. 9, p. 1210-1214, 2007.
- CARROZZA, M. L.; MAZZEI, M.; LACERENZA, D. *et al.* Seroconversion against su5 derived synthetic peptides in sheep experimentally infected with different srlv genotypes. *Veterinary Microbiology*, v. 137, n. 3-4, p. 369-374, 2009.
- CASTRO, R. S.; GREENLAND, T.; LEITE, R. C. *et al.* Conserved sequence motifs involving the tat reading frame of brazilian caprine lentiviruses indicate affiliations to both caprine arthritis-encephalitis virus and visna-maedi virus. *The Journal of General Virology*, v. 80 n. 7, p. 1583-1589, 1999.
- DE ANDRÉS, X.; RAMÍREZ, H.; BERTOLOTTI, L. *et al.* An insight into a combination of elisa strategies to diagnose small ruminant lentivirus infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 152, n. 3-4, p. 277-288, 2013.
- GERMAIN, K.; VALAS, S. Distribution and heterogeneity of small ruminant lentivirus envelope subtypes in naturally infected french sheep. *Virus Research*, v. 120, p. 156-162, 2006.
- GIAMMARIOLI, M.; BAZZUCCHI, M.; PUGGIONI, G. *et al.* Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (srlv) in italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes*, v. 43, n. 3, p. 380-384, 2011.
- GJERSET, B.; JONASSEN, C. M.; RIMSTAD, E. Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the norwegian sheep and goat populations. *Virus Research*, v. 125, n. 2, p. 153-161, 2007.

- GOGOLEWSKI, R. P.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C. *et al.* Antigenic cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis, visna and progressive pneumonia viruses involves all virion-associated proteins and glycoproteins. *The Journal of General Virology*, v. 66 (Pt 6), p. 1233-1240, 1985.
- GREGO, E.; BERTOLOTTI, L.; CARROZZA, M. L. *et al.* Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. *Veterinary Microbiology*, v. 106, n. 3-4, p. 179-185, 2005.
- HERRMANN-HOESING, L. M. Diagnostic assays used to control small ruminant lentiviruses. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, v. 22, p. 843-855, 2010.
- HERRMANN, L. M.; CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. *et al.* Competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to caprine arthritis-encephalitis virus: Diagnostic tool for successful eradication. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 10, n. 2, p. 267-271, 2003.
- HOTZEL, I.; KUMPULA-MCWHIRTER, N.; CHEEVERS, W. P. Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface glycoprotein during persistent infection. *Virus Research*, v. 84, n. 1-2, p. 17-25, 2002.
- LACERENZA, D.; GIAMMARIOLI, M.; GREGO, E. *et al.* Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 112, n. 3-4, p. 267-271, 2006.
- LEROUX, C.; CRUZ, J. C.; MORNEX, J. F. Srlvs: A genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. *Current HIV Research*, v. 8, n. 1, p. 94-100, 2010.
- LIMA, C. C. V.; COSTA, J. N.; SOUZA, T. S. *et al.* Levantamento soro-epidemiológico de artrite-encefalite caprina em rebanhos caprinos no semiárido baiano. In: IX CONGRESSO BRASILEIRO BUIATRIA, IX, 4 (Supl.3), 2011, Goiânia - Goiás, Brasil. Anais.: Rev Vet Zootec (FMVZ UNESP – Campus de Botucatu), 2011, p. 701-704.
- MARTINS, G.; LILENBAUM, W. Possible effect of association with cooperatives in the control of caprine arthritis-encephalitis in rio de janeiro, brazil. *The Veterinary Record*, v. 169, n. 16, p. 416, 2011.
- MORDASINI, F.; VOGT, H.-R.; ZAHNO, M.-L. *et al.* Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 981-991, 2006.
- OIE. *Prescribed and alternative diagnostic for oie listed diseases*: OIE - World organisation for animal health, 2013. Cap. 1.3, p. 1-4. Disponível em: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em: 09/03/2013.
- OLECH, M.; RACHID, A.; CROISE, B. *et al.* Genetic and antigenic characterization of small ruminant lentiviruses circulating in poland. *Virus Research*, v. 163, n. 2, p. 528-536, 2012.
- PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J. *et al.* Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (srlvs) infection and eradication schemes. *Veterinary Research*, v. 35, n. 3, p. 257-274, 2004.
- PISONI, G.; BERTONI, G.; PURICELLI, M. *et al.* Demonstration of coinfection with and recombination by caprine arthritis-encephalitis virus and maedi-visna virus in naturally infected goats. *Journal of Virology*, v. 81, n. 10, p. 4948-4955, 2007.
- PISONI, G.; QUASSO, A.; MORONI, P. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype b1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology*, v. 339, n. 2, p. 147-152, 2005.

RACHID, A.; CROISE, B.; RUSSO, P. *et al.* Diverse host-virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. *The Journal of General Virology*, 2013.

REINA, R.; BERTOLOTTI, L.; DEI GIUDICI, S. *et al.* Small ruminant lentivirus genotype e is widespread in sarda goat. *Veterinary Microbiology*, v. 144., n. 1-2, p. 24-31, 2011.

REINA, R.; MORA, M. I.; GLARIA, I. *et al.* Molecular characterization and phylogenetic study of maedi visna and caprine arthritis encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Research*, v. 121, n. 2, p. 189-198, 2006.

ROSATI, S.; PROFITI, M.; GREGO, E. *et al.* Antigenic variability of ovine lentivirus isolated in Italy. *Veterinary Research Communications*, v. 28 Suppl 1, p. 319-322, 2004.

SARDI, S. I.; SENA, G. S. R.; CAMPOS, G. S. *et al.* Ocorrência de lentivírus de pequenos ruminantes no semiárido baiano e perfil da caprino/ovinocultura na região. *Ciência Animal Brasileira*, v. 13, n. 4, p. 494-503, 2012.

SHAH, C.; BONI, J.; HUDER, J. B. *et al.* 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*, v. 319, n. 1, p. 12-26, 2004a.

SHAH, C.; HUDER, J. B.; BONI, J. *et al.* Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype a4 from goats to sheep and vice versa. *Journal of Virology*, v. 78, n. 14, p. 7518-7522, 2004b.

VALAS, S.; BENOIT, C.; BAUDRY, C. *et al.* Variability and immunogenicity of caprine arthritis-encephalitis virus surface glycoprotein. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 6178-6185, 2000.

ZANONI, R. G. Phylogenetic analysis of small ruminant lentiviruses. *Journal of General Virology*, v. 79, p. 1951-1961, 1998.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente o rebanho brasileiro representa 1,3% do efetivo mundial com 9.384.894 cabeças onde 91% estão estabelecidos na região Nordeste brasileira. A caprino-ovinocultura representa uma fonte de sustentabilidade econômica e social para o Brasil, entretanto a prevalência das lentivirose (LVPR) vem reduzindo o potencial produtivo e reprodutivo dos animais infectados. Este estudo, ao isolar LVPR e identificá-los por caracterização genética e antigênica, mostrou que os rebanhos de ovinos e caprinos das principais regiões (NE e SE) de caprino-ovinocultura Brasileira estão infectados com os subtipos B1(CAEV) e A13 (MVV) de LVPR. Estes genótipos de LVPR foram identificados nas espécies de caprinos e ovinos, evidenciando que houve transmissão interespecie, como tem sido comprovado em outros países. Este fator tem grande impacto para disseminação da infecção, dificultando a possibilidade de controle e influenciando o diagnóstico.

Medidas atreladas ao controle das LVPR precisam ser administradas, principalmente, direcionado a segregação dos animais infectados, inclusive as espécies caprinas e ovinas em rebanhos consorciados. Este controle necessita de um suporte diagnóstico sensível e específico, para identificação precisa dos animais infectados. A técnica diagnóstica oficialmente recomendada no Brasil, o IDGA, confere ótima especificidade, mas limitada sensibilidade. E a associação do IDGA com a técnica de ELISA constituída de proteínas recombinantes de MA/CA e SU construídas a partir dos genótipos B1 e A13 pode contribuir para o diagnóstico completo e seguro dos LVPR no Brasil.

Adicionalmente, embora os antígenos utilizados nos diagnósticos da artrite encefalite caprina (CAE) no Brasil sejam produzidos com a cepa CAEV cork, que é o mesmo subtipo identificado na maioria dos caprinos nos rebanhos brasileiros, outros tipos de LVPR também estão presentes no Brasil, e um antígeno que identifique o maior número possível de subtipos é essencial para o diagnóstico.

Em virtude da heterogeneidade do genótipo A, da frequente dupla reatividade nos antígenos SSB1 e SS0013 e que foi identificado geneticamente dois isolados brasileiros de genótipo A, divergentes dos subtipos já existentes, é necessário a caracterização antigênica com outros subtipos do grupo A.

CONCLUSÕES FINAIS

Neste estudo isolou-se 42 estirpes de LVPR em caprinos oriundos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, com caracterização genética e antigênica, principalmente, para o subtipo B1 de LVPR. Entretanto, ovinos foram classificados com o mesmo subtipo, comprovando a transmissão natural de CAEV entre as espécies de caprinos e ovinos no Brasil. Adicionalmente, ocorreu recombinação genética ou coinfeção de LVPR em caprinos.

Estes resultados demonstram a diversidade genética e antigênica de estirpes de LVPR circulantes no Brasil e confirmam a necessidade de considerar todos os genótipos virais em antígenos utilizados em testes sorológicos, a fim de evitar diagnósticos incorretos e aumentar a acurácia dos mesmos nos programas de controles dos LVPR.