

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós Graduação em Ciência Animal

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA BOVINA
(BIV) EM BOVINOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Ana Paula de Souza Rodrigues

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2014

Ana Paula de Souza Rodrigues

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA BOVINA
(BIV) EM BOVINOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Dissertação apresentada à UFMG, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte

Escola de Veterinária da UFMG

2014

R696d Rodrigues, Ana Paula de Souza, 1989-
Detecção molecular do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em bovinos do Estado de Minas Gerais / Ana Paula de Souza Rodrigues. – 2014.
45 p. : il.

Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Bovino – Doenças – Teses. 2. Lentivírus – Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.208 96

Dissertação defendida e aprovada em 24 de fevereiro de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente - Orientador



Dr. Marcelo Fernandes Camargos
LANAGRO



Dr. Antonio Augusto Fonseca Júnior
LANAGRO

DEDICATÓRIA

Esta dissertação de mestrado é dedicada aos meus pais, pelo exemplo de amor, força, superação, dignidade e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não foi fácil, mas olhando para o meu caminho, posso perceber a grandeza do amor de Deus e a perfeição de tudo que Ele faz.

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e sabedoria para chegar até aqui, por iluminar os meus passos e tornar este momento o início de uma nova jornada de grandes realizações.

Aos meus pais, por muitas vezes, terem abdicado de realizações em prol dos meus objetivos. Pelo estímulo e fiel compreensão que me mostraram que tudo que é mais difícil, será mais valorizado.

Ao meu irmão, que mesmo muitas vezes distante, está sempre do meu lado.

A minha família, especialmente a minha prima Aline e meu avô Alberto, que conseguiram me proporcionar alegrias mesmo em momentos tão difíceis.

Ao meu grande e eterno amor Alvande, pela força, amor, paciência e dedicação incondicional, muito importantes nesta conquista. Te amo!

A minha segunda família, Sra. Graça, Sr. Alvande e Tati, pela compreensão e exemplo.

A Fabiana Alves, pela indicação.

Ao meu orientador, prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, pela confiança, prestatividade, oportunidade, paciência, carinho e orientação.

Ao prof. Rômulo Cerqueira Leite, pela confiança, por ter aberto as portas do laboratório, pelo apoio incondicional e por ter instigado em mim uma imensa vontade de continuar na área veterinária.

Ao pesquisador Dr. Charles Wood, pela gentil contribuição através do plasmídeo BIV, pois o desenvolvimento deste trabalho só foi possível graças a esta contribuição.

A Graciela pelo apoio e paciência mútua, contribuições, “socorros” e análises.

A minha “irmãzinha” Grazielle, pelo carinho ímpar, amizade, e por estar presente em todos os momentos mais difíceis.

Aos técnicos e funcionários, em especial ao Eduardo, Agda, Júnia e Derci.

A família RetroLab, Paula, João, Juliana, André, Cairo, Fernanda, Raquel, Isabella, Stefanne, Gissandra, Cláudia, Luciana, Lízia e Telissa, pelo carinho, contribuições e momentos de plena alegria, vocês são mais que amigos, são uma verdadeira família, vocês estarão para sempre em meu coração. Adoro vocês!

Aos afilhados do RetroLab, Jamili, pela amizade verdadeira e confiança. Ermilton e Amanda, pelo carinho, coletas e alegrias.

A Tatiana Flávia, pela amizade, auxílio ímpar e momentos de descontração.

Ao Antônio Augusto, pela paciência e auxílio nas análises.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que entenderam minhas ausências, acreditaram em minha capacidade e me deram força, pois não teria percorrido este caminho se não fosse pela ajuda de vocês!

“Mas pra quem tem pensamento forte, o impossível é só questão de opinião.”

(Charlie Brown Jr)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Experimento.....	21
3.2 Aspectos éticos e de Biossegurança.....	21
3.3 Amostras de sangue.....	21
3.4 Extração do DNA genômico proviral.....	21
3.5 Quantificação do DNA extraído.....	22
3.6 Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs).....	22
3.6.1 PCR para o gene GAPDH.....	22
3.6.2 PCRs para detecção de BIV.....	23
3.6.3 PCR e PCR <i>Semi Nested</i> (PCR-SN) para BIV.....	23
3.7 Controle positivo.....	24
3.8 Caracterização e otimização das PCRS para BIV.....	24
3.8.1 Otimização da temperatura de anelamento para a PCR-SN.....	24
3.8.2 Sensibilidade analítica da PCR-SN.....	24
3.8.3 Especificidade analítica dos iniciadores para o BIV.....	24
3.9 Clonagens.....	25
3.9.1 Amplificação do inserto do plasmídeo para obtenção de controle positivo.....	25
3.10 Clonagem das sequências BIV- <i>pol</i> amplificadas das amostras de campo.....	25
3.11 Sequenciamento nucleotídico das amostras (<i>pol</i> -BIV) de campo clonadas em plasmídeo pGEM.....	26
3.12 Análise molecular.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 PCR GAPDH.....	26

4.2	Otimização da temperatura de anelamento.....	27
4.3	Especificidade da PCR-SN.....	28
4.4	Sensibilidade da PCR-SN.....	29
4.5	PCR <i>SemiNested</i>	30
4.6	Clonagem dos fragmentos de interesse.....	35
4.7	Análises moleculares.....	35
5.	CONCLUSÕES.....	38
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Manifestações clínicas e patológicas dos Lentivírus.....	16
Tabela 2-	Oligonucleotídeos iniciadores para o GAPDH.....	22
Tabela 3-	Porcentagem e total de animais positivos por fazenda testados através PCR-SN. Fazendas I a IV (gado de leite) localizadas em duas regiões - Zona da Mata e Central - de Minas Gerais.....	32
Tabela 4-	Ocorrência e distribuição mundial do BIV.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Morfologia esquemática do vírus da imunodeficiência bovina (BIV). O envelope viral é composto pela proteína de superfície (SU) gp 100, glicoproteína transmembrana (TM) gp45 e a proteína p16 que forma a matriz viral. A estrutura em forma de cone típica dos lentivírus é composta da proteína do capsídeo viral p26 envolvendo a proteína da enzima integrase (IN), a protease (PR) e transcriptase reversa (RT) e o RNA genômico, que é protegido pelo capsídeo, formando o nucleocapsídeo (NC).....	18
Figura 2-	O genoma proviral do vírus da imunodeficiência bovina (BIV). LTR: região repetida terminal. Gene gag (antígenos específicos de grupo); pol (polimerase); env (envelope). Genes regulatórios/acessórios: tat, rev, vif, vpr, vpx (y), vpw (w) e tmx.....	18
Figura 3-	Amplificação do gene GAPDH do DNA das amostras extraídas da camada leucocitária de bovinos em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb. Canaleta 2: Controle negativo. Canaletas 3-22: Produto de PCR para amplificação do gene GAPDH. Este padrão de amplificação esteve presente em 96,93% das amostras.....	27
Figura 4-	Gradiente de temperatura de anelamento ótima utilizando como template duas sequências clonadas (MG79 e MG613). Temperaturas aplicadas no gradiente: 54, 56, 58, 60, 62 e 64°C resolvidas	

em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0 mg/μL), em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) pH 8,3.....28

Figura 5- Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a especificidade analítica dos iniciadores utilizados na PCR-SN. Amostras de DNA de 4 vírus foram utilizadas como *template*. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: DNA BIV positivo. Canaleta 3: DNA IBR positivo. Canaleta 4: DNA Pox positivo. Canaleta 5: DNA BLV positivo. Canaleta 6: DNA BLHV positivo. Canaleta 7: Controle negativo.....29

Figura 6- Avaliação da sensibilidade analítica da PCR *semi-nested* (PCR-SN) na detecção do gene *pol* do BIV, realizada através do clone MG79. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Clone MG079 puro. Canaletas 3-12: Diluições crescentes do clone correspondentes a 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9} ; 10^{-10} ; 10^{-11} ; 10^{-12} e 10^{-13} . Canaleta 13: Controle negativo.....30

Figura 7- Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação do gene *pol* através da PCR-SN. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb. Canaleta 2: Controle positivo. Canaleta 3: Controle negativo. Canaletas 4-8: Amostras de DNA de bovinos.....31

Figura 8- Fragmentos *pol* clonados em plasmídeos pGEM a partir de amostras de campo do BIV isolada de bovinos em Minas Gerais. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Controle positivo. Canaleta 3: Controle negativo. Canaleta 4: Clone MG46. Canaleta 5: Clone MG79. Canaleta 6: Clone MG613. Canaleta 7: Clone MG658. Canaleta 8: Clone MGRA. Canaleta 9: Clone MGTO.....35

Figura 9- Comparação das sequências provirais dos fragmentos da região *pol* amplificados a partir da PCR-SN. As sequências foram derivadas dos clones de amostras de campo MG046, MG079, MG613, MG617 e MGTO. Estas sequências foram alinhadas e comparadas com as sequências publicadas do genoma completo proviral do BIV, do isolado R-29 e dos isolados da Flórida FL112 e FL491. Os pontos indicam bases idênticas. Letras indicam substituições.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida
EIAV – vírus da anemia infecciosa equina
BIV – vírus da imunodeficiência bovina
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
BLV – vírus da leucose enzoótica bovina
BoHV-6 – herpes vírus bovino tipo 6
CA – capsídeo viral
CAEV – vírus da artrite encefalite caprina
DMVP – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP – deoxirribonucleotídeo
ELISA – ensaio imunoenzimático ligado a enzima
Env – envelope
EV – Escola de Veterinária
FIV – vírus da imunodeficiência felina
Gag – grupo antígeno específico
GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IBR – vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina
IFA – imunofluorescência indireta
IN – integrase
IPTG – isopropylthio- β -galactoside
JVD – vírus da doença de Jembrana
LB – Luria-Bertani
LTR – regiões longas terminais
MG – Minas Gerais
 μ L – microlitro
MVV – *vírus maed-visna*
NC – nucleocapsídeo
NCBI – National Center for Biotechnology Information
ng – nanograma
PBMC – células mononucleares do sangue periférico
pmol – picomol
PCR – reação em cadeia da polimerase
Pol – polimerase
PR – protease
RetroLab – Laboratório de Retrovírus
RNA – ácido ribonucleico
RT – transcriptase reversa
RT-PCR – transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
SIV – vírus da imunodeficiência símia
SU – superfície viral
Taq – *Thermus aquaticus*
TM - proteína transmembrana
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VACV – vírus vaccínia

XGal –5-bromo-4-chloro-3indolyl-beta-D-galacto-pyranoside

RESUMO

O vírus da imunodeficiência bovina (BIV) é o agente causador da imunodeficiência viral bovina em bovinos. Embora a infecção seja relatada em vários países do mundo, a relevância desta infecção no Brasil ainda é desconhecida. Neste estudo foi feita a detecção do DNA proviral do BIV em 391 amostras de sangue de bovinos de leite através da reação em cadeia da polimerase - *semi-nested* (PCR-SN) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região *pol* do genoma do vírus. Amostras de sangue foram obtidas de duas regiões do estado de Minas Gerais. Os resultados da PCR-SN demonstraram que a ocorrência do vírus no estado foi de 12,5%. As sequências amplificadas foram confirmadas por clonagem e sequenciamento de nucleotídeos. A similaridade da sequência de nucleotídeos das amostras isoladas com a estirpe de referência (R-29) foi de 99%. Os resultados obtidos indicam a necessidade de realizar um estudo detalhado sobre a prevalência da infecção do BIV no Brasil, e mais particularmente sua associação com diversas doenças prevalentes nos bovinos, que podem contribuir de forma negativa para a bovinocultura do país.

Palavras chave: vírus da imunodeficiência bovina, PCR *semi-nested*, ocorrência, Minas Gerais.

ABSTRACT

The bovine immunodeficiency virus (BIV) is the agent causing of bovine immunodeficiency in cattle. Although infection is reported in several countries, the occurrence of this infection in Brazil is still unknown. This study was done to detect the BIV proviral DNA of 391 samples of bovine blood from dairy cattle by semi-nested polymerase chain reaction (SN-PCR) *Semi Nested* using specific primers for the *pol* region of the virus genome. Blood samples were derived from two regions of the state of Minas Gerais. The results of the SN-PCR demonstrated an occurrence of 12,5% in the state. The amplified sequences were confirmed by cloning and nucleotide sequencing. The similarity of the nucleotide sequence of the BIV isolated samples with the reference strain (R-29) was 99%. The results indicate the need to conduct a detailed study on the prevalence of BIV infection in Brazil, and more particularly its association with various diseases that are prevalent in cattle, which may contribute negatively to the cattle industry in the country.

Keywords: Bovine immunodeficiency virus, semi-nested PCR, occurrence, Minas Gerais.

1. INTRODUÇÃO

O vírus da imunodeficiência bovina (BIV), também conhecido como lentivírus bovino é membro da família *Retroviridae*, e é o agente etiológico da imunodeficiência viral bovina, doença que acomete bovinos de várias idades. O BIV foi isolado pela primeira vez em 1972 nos Estados Unidos, de uma vaca de 8 anos de idade que apresentava linfocitose persistente, linfadenopatia, fraqueza progressiva, emaciação, cansaço e lesões no sistema nervoso central, e foi designado originalmente como isolado R-29. Devido a sua ampla semelhança com o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), o BIV tem sido utilizado como modelo animal para a compreensão da patogênese do HIV-1. O BIV apresenta ampla distribuição geográfica, com prevalência tanto no rebanho leiteiro como no de corte e pode ser transmitido verticalmente no útero por via transplacentária e pelo colostro, ou horizontalmente através da troca de fluídos corporais e pelo sangue. O vírus possui um longo período de incubação e a doença não apresenta sinais clínicos evidentes, mas uma vez infectados os animais podem apresentar linfocitose, linfadenopatia, emagrecimento, fraqueza, diminuição da produção de leite e algumas infecções secundárias. O diagnóstico pode ser feito através da detecção sorológica ou detecção molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR). O controle da infecção consiste na detecção precoce dos animais positivos do rebanho e sua eliminação ou segregação, uma vez que não existe uma vacina comercial disponível. Devido à ampla distribuição mundial, a ocorrência da doença em países vizinhos, e a escassez de estudos no Brasil, o objetivo deste trabalho foi padronizar um ensaio de PCR *SemiNested* para detecção do BIV em bovinos e estimar a ocorrência da infecção em bovinos do estado de Minas Gerais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A família *Retroviridae* é composta por uma gama de vírus que infectam várias espécies animais e englobam uma grande variedade taxonômica (St-Louis *et al.*, 2004). Os retrovírus possuem uma estrutura complexa, e apresentam em seu genoma duas moléculas idênticas de RNA linear de fita simples. São assim denominados por possuírem a enzima transcriptase reversa que, durante o ciclo replicativo tem a capacidade de sintetizar uma molécula de DNA a partir do genoma viral de RNA, processo denominado transcrição reversa (Flores, 2007; Corredor *et al.*, 2010). Durante este processo, este DNA é incorporado no núcleo da célula do hospedeiro na forma de provírus, assegurando que, uma vez infectados, estes hospedeiros tornem-se portadores do vírus pelo resto da vida (Flores, 2007; Patil *et al.*, 2003). O provírus permanece latente por muitos anos sem causar nenhum dano ao hospedeiro. Porém, na presença de fatores predisponentes, tais como infecção concomitante, estresse e avanço na idade, o provírus pode ser reativado em vírus RNA infeccioso e pode iniciar patogênese dentro do hospedeiro (Bhatia *et al.*, 2013).

O vírus da imunodeficiência viral bovina (BIV) pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus*. Os lentivírus são os únicos vírus desta família que compartilham propriedades estruturais, biológicas, genéticas e patogênicas entre si. Além do BIV, estão incluídos neste gênero os vírus da anemia infecciosa equina (EIAV), vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), vírus da imunodeficiência felina (FIV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência símia (SIV), vírus *maedi-visna* (MVV) e vírus da doença de Jembrana (JDV) (Patil *et al.*, 2003). Suas respectivas manifestações clínicas e patológicas estão representadas na Tabela 1.

Os lentivírus são exógenos, não oncogênicos, distribuídos mundialmente, e a maioria infecta monócitos e macrófagos, porém o FIV, HIV e SIV infectam também linfócitos T e são associados principalmente com sinais clínicos de imunodeficiência em hospedeiros infectados (Momtaz *et al.*, 2010; Tajbakhsh *et al.*, 2010), onde podem se replicar em células que não estão em divisão (St-Louis *et al.*, 2004). O genoma dos lentivírus inclui genes acessórios/regulatórios que codificam proteínas, muitas das quais estão envolvidas na regulação da expressão viral (St-Louis *et al.*, 2004).

Tabela 1: Manifestações clínicas e patológicas dos Lentivírus.

Lentivírus	Hospedeiro	Manifestações Clínicas/Patológicas
Vírus da anemia infecciosa equina (EIAV)	Equinos	Anemia hemolítica, glomerulonefrite, encefalopatia
Vírus da artrite encefalite caprina (CAEV)	Caprinos	Artrite, encefalite, paralisia
Vírus da imunodeficiência felina (FIV)	Felinos	Imunodeficiência, linfadenopatia, leucopenia, anemia, infecções oportunistas
Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	Humanos	Imunodeficiência, linfadenopatia, infecções oportunistas, encefalopatia
Vírus da imunodeficiência bovina (BIV)	Bovinos	Linfocitose, linfadenopatia, infecções oportunistas, lesões do sistema nervoso central, fraqueza, emagrecimento
Vírus da imunodeficiência símia (SIV)	Primatas	Imunodeficiência, neuropatologia, infecções oportunistas em macaco Rhesus
Vírus <i>Maed-Visna</i> (MVV)	Ovinos	Encefalite, pneumonia, linfadenopatia, paralisia, infecções oportunistas
Vírus da doença de Jembrana (JDV)	Gado de Bali	Febre, letargia, anorexia e linfadenopatia

Adaptada de St-Louis *et al.*, 2004.

Em 1969, após intensiva busca pelo agente causador da leucose enzoótica bovina, o experiente veterinário Dr. Cameron Seger em colaboração com o Dr. Martin Van der Maater realizou um estudo de campo com o rebanho leiteiro da Estação Experimental do Sudeste da Louisiana em Franklinton, Estados Unidos. Após vários exames, foi observado que estes animais apresentavam um elevado número de células brancas circulantes, que foi atribuído ao aumento de linfócitos, condição referente a um quadro clínico de leucose. Esta linfocitose persistiu durante meses e os pesquisadores acreditaram que, como a leucose ainda não estava bem descrita este estudo poderia auxiliar na identificação do agente causador da doença em bovinos (Gonda *et al.*, 1994).

Mudanças nas condições físicas de uma vaca leiteira prenhe de oito anos de idade (vaca R-29) focaram a atenção do Dr. Seger. O animal apresentava alguns sinais clínicos, como elevada contagem de células brancas circulantes, linfadenopatia, lesões evidentes no sistema nervoso central, fraqueza progressiva e emagrecimento, sugerindo um quadro típico de leucose (Gonda *et al.*, 1994; St-Louis *et al.*, 2004). Após o nascimento do bezerro, as condições da vaca pioraram e todas as tentativas para reverter o quadro falharam, até o que o animal veio a óbito. Uma necropsia foi realizada revelando lesões clínicas e histopatológicas, incluindo infiltrados perivasculares em alguns vasos no cérebro e aumento de gânglios linfáticos. Cortes histológicos foram analisados para avaliar a possível causa da doença (Suarez *et al.*, 1993; Gonda *et al.*, 1994).

Em 1972, Van der Maaten e colaboradores estudaram bezerros privados de colostro bovino, inoculados com células infectadas com leucócitos e tecidos da vaca R-29. Estes animais não apresentaram sinais clínicos evidentes, porém, desenvolveram linfadenopatia facilmente detectáveis em linfonodos subcutâneos e uma leucocitose persistente por vários meses durante o estudo. Análises histopatológicas dos linfonodos destes bezerros revelaram hiperplasia folicular e a presença de infiltrado de células mononucleares perivasculares, conforme observado anteriormente na vaca R-29 (Gonda *et al.*, 1994; Onuma *et al.*, 1992; Corredor *et al.*, 2010). Nenhum bezerro experimentalmente infectado desenvolveu linfossarcoma, descartando assim a possibilidade do agente causador desta doença ser o vírus da leucose enzoótica bovina (Gonda *et al.*, 1994).

Análises microscópicas revelaram um vírus indutor de sincícios que devido a semelhanças com o lentivírus ovino, foi primeiramente designado como vírus bovino semelhante ao visna (Van der Maaten *et al.*, 1972; Suarez *et al.*, 1993; Gonda *et al.*, 1994). Durante anos, nenhum interesse foi demonstrado neste vírus, devido ao fato de ele não ser o agente causador da leucose bovina, e não estar aparentemente relacionado a nenhuma enfermidade (Flores, 2007, Bhatia *et al.*, 2013). O interesse só foi demonstrado após o isolamento do HIV, na década de 1980, devido à emergência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), visando à necessidade urgente em desenvolver modelos animais para um possível tratamento e controle do HIV na população humana (Su *et al.*, 2010). Após esta necessidade, e com a descoberta de que a AIDS era causada por um lentivírus, pesquisadores levantaram questões sobre a relevância destes vírus para a medicina veterinária e humana (Meas *et al.*, 1998), e sugeriram que este vírus semelhante poderia ser uma alternativa como modelo animal substituto para pesquisas com o HIV (St-Louis *et al.*, 2004). Análises moleculares e imunológicas demonstraram que o isolado da vaca R-29 se assemelhava genética, bioquímica, imunológica, antigênica e estruturalmente ao vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (González *et al.*, 2008). Como consequência, Gonda e colaboradores em 1987, atribuíram uma nova nomenclatura ao vírus, designando-o de vírus semelhante ao da imunodeficiência bovina, conhecido atualmente apenas como vírus da imunodeficiência bovina (BIV).

Por ser muito semelhante ao HIV e não infectar seres humanos (Meas *et al.*, 1998; Su *et al.*, 2010), o BIV tem sido usado como modelo biológico potencialmente útil para a compreensão da patogênese do HIV-1 em métodos de avaliação da eficácia dos tratamentos, teste de drogas antirretrovirais e controle da infecção viral (Daffner & Scotti, 1997; Flores, 2007; Yin *et al.*, 2008). A partir do isolado R-29, Braun e colaboradores em 1988 caracterizaram molecularmente o BIV 106 e o BIV 107, clones infecciosos de cDNA, que auxiliaram na melhor compreensão do BIV.

O BIV é um vírus envelopado com aproximadamente 120-130 nm de diâmetro (Figura 1). O envelope viral apresenta uma bicamada lipídica e é composto pela proteína da superfície viral (SU) gp100 e a proteína transmembrana (TM) gp45 que envolvem o capsídeo viral (CA) cônico, típico dos lentivírus, e as proteínas do nucleocapsídeo (NC) que protegem o genoma (St-Louis *et al.*, 2004; Corredor *et al.*, 2010; Momtaz *et al.*, 2010).

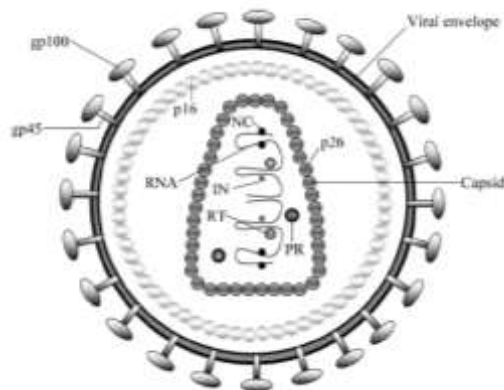


Figura 1. Morfologia esquemática do vírus da imunodeficiência bovina (BIV). O envelope viral é composto pela proteína de superfície (SU) gp 100, glicoproteína transmembrana (TM) gp45 e a proteína p16 que forma a matriz viral (M). A estrutura em forma de cone típica dos lentivírus é composta da proteína do capsídeo viral p26 (CA) envolvendo a proteína da enzima integrase (IN), a protease (PR) e transcriptase reversa (RT) e o RNA genômico, que é protegido pelo capsídeo, formando o nucleocapsídeo (NC). (Corredor *et al.*, 2004)

O genoma do BIV é o mais complexo dos lentivírus não primatas. O DNA proviral contém 8960 pb e apresenta os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, flanqueados pelas 5' e 3' das LTRs e os genes acessórios/regulatórios dispostos e sobrepostos entre os genes *pol* e *env*, os *Vpw*, *Vpy*, *Vif*, *Tat*, *Rev*, e *Tmx* (Figura 2) (ST-LOUIS *et al.*, 2005; Corredor *et al.*, 2010).

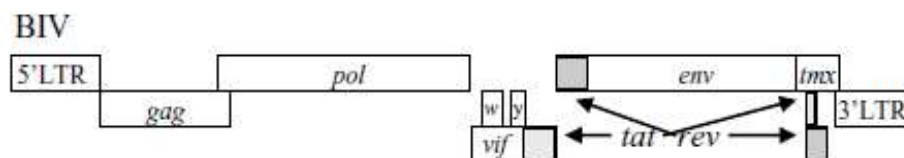


Figura 2. Esquema do genoma proviral do vírus da imunodeficiência bovina (BIV). LTR: região repetida terminal. Gene *gag* (antígenos específicos de grupo); *pol* (polimerase); *env* (envelope). Genes regulatórios/acessórios: *tat*, *rev*, *vif*, *vpy* (y), *vpw* (w) e *tmx*. Adaptado de Corredor *et al.* (2010).

Evidências sorológicas sugerem que o BIV esteja distribuído mundialmente (Andrews, 2008) e estudos soropidemiológicos e moleculares mostram registros variando de 1,4% a 66% de prevalência de infecções (tabela 4) onde desde sua primeira descrição em 1972, esta prevalência tem sido relatada em gados leiteiros e de corte no Canadá (McNab *et al.*, 1994), Estados Unidos (Amborski *et al.*, 1989; Cockerell *et al.*, 1992; Moody *et al.*, 2002), Brasil (Meas *et al.*, 2002), Argentina (González *et al.*, 2008), Venezuela (Walder *et al.*, 1995), França (Polack *et al.*, 1996), Alemanha (Muluneh, 1994), Itália (Cavirani *et al.*, 1998), Suíça e Holanda (Horzinek *et al.*, 1991), Reino Unido (Scobie *et al.*, 2001), Costa Rica (Gonda *et al.*, 1994), Turquia (Meas *et al.*,

2003), Nova Zelândia (Horner, 1991), Austrália (Forman *et al.*, 1992), Japão (Meas *et al.*, 1998), Coreia (Cho *et al.*, 1999), Índia (Patil *et al.*, 2003), Irã (Brujeni *et al.*, 2010; Tajbakhsh *et al.*, 2010), Polônia (Rola-Luszczak *et al.*, 2011), Zâmbia (Meas *et al.*, 2004) e há relatos de infecção em búfalos no Paquistão (Meas *et al.*, 2000), e em animais de tração no Camboja (Meas *et al.*, 2000) e na Indonésia (Barboni *et al.*, 2001).

Embora o modo de transmissão ainda não esteja totalmente esclarecido, é conhecido que o BIV pode ser transmitido verticalmente pelo colostro ou no útero por via transplacentária, e horizontalmente através da troca de fluidos corporais e pelo sangue (Moody *et al.*, 2002; Meas *et al.*, 2002). O DNA proviral do BIV já foi detectado *in vivo* em uma grande variedade de tecidos bovinos, incluindo cérebro, pulmões, nódulos linfáticos, baço, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e sêmen de animais infectados (Corredor *et al.*, 2010).

A transmissão experimental do BIV pode ocorrer através da administração de sangue de um animal infectado para um animal saudável por via intravenosa (Bellock *et al.*, 1996). O uso de agulhas e materiais cirúrgicos contaminados, ingestão de colostro de fêmeas infectadas e a higienização deficiente de instrumentos utilizados em práticas invasivas, como castrações e descornas, também podem ser fatores responsáveis pela transmissão do vírus (Ravazzolo e Costa, 2007). Sob condições naturais, os lentivírus são espécie-específicos, e o BIV infecta naturalmente bovinos, mas pode infectar experimentalmente ovinos, caprinos e coelhos. (St-Loius *et al.*, 2004; Ravazzolo e Costa, 2007). Segundo Corredor e colaboradores (2010) o vírus replicado em células *in vitro* destes animais induz um efeito citopático caracterizado pela formação de sincícios.

A imunodeficiência viral bovina induz poucos sinais clínicos, e atualmente não tem sido associada ao desenvolvimento de nenhuma doença ou síndrome clinicamente identificável (Bhatia *et al.*, 2013), mas é conhecido que, em animais experimentalmente infectados a doença tem uma progressão semelhante àquela observada nos casos de HIV. Como consequência os animais apresentam uma infecção crônica e persistente pelo resto da vida. Há poucos estudos demonstrando que o BIV seja capaz de, isoladamente, produzir manifestações clínicas patológicas específicas, e em muitos casos, a infecção pode estar associada à outra enfermidade viral, como a leucose enzoótica bovina, aumentando assim a probabilidade do aparecimento de sinais clínicos (Andrews, 2008).

Em bovinos experimentalmente infectados, os animais podem apresentar linfocitose, hiperplasia linfóide e infecções bacterianas secundárias (Brujeni *et al.*, 2010). Estudos experimentais têm demonstrado a presença de encefalite sem evidência de outros sinais clínicos (Snider, 1996). Já em achados de necropsias, algumas alterações clínicas foram percebidas, incluindo infiltrados linfocitários perivasculares cerebrais leves (Moody, *et al.*, 2002). Alguns sinais ainda podem ser percebidos tais como claudicação ou andar rígido, que podem acometer um ou mais membros. Notam-se ainda sinais nervosos, como alterações de comportamento, irritação e comportamento agressivo, apresentados por alguns animais. Em outros casos, é possível constatar depressão, letargia, ataxia, e, às vezes, decúbito. Alguns animais ainda podem exibir prolapso da terceira pálpebra (Andrews, 2008). Há evidências que uma imunossupressão seja causada devido à infecção pelo BIV, aumentando assim a incidência de infecções secundárias (Brujeni *et al.*, 2010).

Segundo McNab e colaboradores (1994), vacas leiteiras canadenses infectadas com BIV apresentaram um decréscimo na produção média de leite, e a ocorrência do vírus também pode ser associada a infecções bacterianas secundárias, complicações no parto e no início da lactação.

Estudos ainda sugerem que haja uma relação entre fatores de estresse e a infecção viral pelo BIV, e que sob condições experimentais, os animais não manifestam totalmente a doença, desde que seja aplicado um manejo de forma correta, eliminando ou evitando o estresse do animal (Snider *et al.*, 1996). Porém, a susceptibilidade à infecção bovina pelo BIV pode depender da cepa do vírus, raças bovinas e de fatores ambientais (Meas *et al.*, 2000; Brujeni *et al.*, 2010).

Atualmente não há um teste de diagnóstico “padrão ouro” para identificação do BIV (Bhatia *et al.*, 2013). O mesmo pode ser realizado através da detecção sorológica, com a utilização de técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFA) (Daffner e Scorti, 1997), ensaios imunoenzimáticos como o *Western Blot* (Andrews, 2008) e o ELISA (González *et al.*, 2008). Também podem ser utilizadas técnicas de detecção direta, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e transcrição reversa de PCR (RT-PCR) (Ravazzolo e Costa, 2007).

O isolamento viral é considerado o exame laboratorial "padrão ouro" para o diagnóstico de muitos patógenos virais (Bhatia *et al.*, 2013), no entanto o BIV não é facilmente isolado principalmente em animais naturalmente infectados, e, devido a esta dificuldade, atualmente só existem quatro isolamentos realizados com sucesso. O primeiro isolamento relatado foi a partir de uma vaca com linfocitose persistente, o isolado americano R-29 (Van der Maaten *et al.*, 1972). Os outros três foram o BIVCR1, isolado na Costa Rica (Hidalgo *et al.*, 1995) e os FL491 e FL112, ambos isolados na Flórida (Suarez *et al.*, 1993). Nos quatro isolados foram utilizadas técnicas de co-cultivo a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de animais infectados, utilizando células fetais de baço bovino, células fetais de pulmão bovino ou células embrionárias de coelho.

Até o momento, não há tratamento disponível para a infecção pelo BIV, sendo recomendado o tratamento das infecções secundárias. Em rebanhos com manejos inadequados (nutricional, reprodutivo e sanitário), os animais podem manifestar os sinais clínicos da doença. Entretanto, em rebanhos com manejo adequado, os sinais clínicos podem ser minimizados ou inaparentes (Andrews, 2008). Ravazzolo e Costa (2007) afirmam que para a prevenção e controle da doença é essencial que o manejo sanitário seja seguido rigorosamente, bem como a utilização de materiais descartáveis em exames médicos, clínicos e reprodutivos.

A presença da infecção do BIV em rebanhos brasileiros foi relatada somente por Meas e colaboradores (2002), através da detecção do DNA proviral em leucócitos do sangue periférico, utilizando a técnica de Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) e a detecção de anticorpos contra a proteína p26 do BIV pelo *Western Blot*. O estudo foi conduzido com 238 animais de seis fazendas diferentes, envolvendo o rebanho de corte e o leiteiro, das regiões de Pelotas no Rio Grande do Sul e de Campo Grande, no Mato Grosso do Sul. Os resultados apresentaram uma ocorrência de 11,7% (28) de animais positivos para BIV, e mostraram também que a prevalência do vírus em rebanhos brasileiros não foi tão alta quando comparada a de outros países.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento

O experimento foi executado no Laboratório de Retrovírus (RetroLab) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária (EV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da UFMG, protocolado sob o nº 356 / 2012.

3.2 Aspectos éticos e de Biossegurança

Toda a manipulação das amostras utilizadas neste experimento, bem como os reagentes e produtos químicos empregados para a elaboração das técnicas laboratoriais, foram realizados utilizando dispositivos de biossegurança segundo as técnicas presentes no Manual de Biossegurança, disponível no RetroLab.

3.3 Amostras de sangue

Amostras de sangue periférico foram coletadas de 391 bovinos leiteiros de várias raças e de ambos os sexos, com idades entre 0 e 12 anos, de quatro fazendas localizadas em duas regiões - Zona da Mata e Central - do estado de Minas Gerais. Na Zona da Mata foram coletadas 163 amostras na Fazenda I e na região Central foram coletadas 112 amostras na Fazenda II, 95 na Fazenda III e 21 na Fazenda IV, onde as fazendas I, II e IV apresentavam sistema de criação semiextensivo e a fazenda III intensivo. As amostras foram coletadas através de punção da veia caudal, em tubos a vácuo *Vacutainer*®, com capacidade para 4 ml, contendo anticoagulante ácido etilenoamino tetra-acético (EDTA). Os tubos foram identificados e encaminhados ao RetroLab, onde foram centrifugados em centrífuga refrigerada modelo *Jouan BR 4i* a 1609 g durante 10 minutos para separação da camada leucocitária. A camada foi retirada e armazenada a -20° C para posterior utilização.

3.4 Extração do DNA genômico proviral

O DNA genômico total contido na camada leucocitária foi extraído através do kit comercial *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit* (Qiagen®, Hilden – Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Este kit destina-se à extração e purificação do DNA total de amostras de sangue, onde o DNA se liga a uma resina existente na coluna e o restante é eliminado através de duas etapas de lavagem e centrifugação. O DNA foi posteriormente eluído com tampão salino previamente aquecido, a fim de facilitar a eluição e conservar sua integridade durante o armazenamento. O protocolo de extração de DNA através deste kit está descrito no anexo 01.

3.5 Quantificação do DNA extraído

A concentração e a pureza do DNA genômico presente em cada amostra foram estimadas através da leitura de densidade óptica em comprimento de onda de 260/280nm em espectrofotômetro *NanoVue*[®] (GE Healthcare, EUA) e eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0 mg/μL), em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) pH 8,3. Uma alíquota de 10 μL de DNA adicionada de 2,0 μL de tampão de amostra (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) foi aplicada no gel. Para comparação visual e cálculo estimado da quantidade de DNA, foi utilizado um marcador padrão de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen) e os resultados foram comparados segundo padrões do RetroLab. O DNA foi aplicado no gel e submetido à eletroforese por 45 minutos a uma voltagem constante de 120 V e corrente de 2,0A. O gel foi visualizado através de um transluminador com exposição à luz ultravioleta, fotografado no sistema de fotodocumentação de géis L-Pix (*Loccus* Biotecnologia, Brasil) e os resultados foram comparados segundo padrões do RetroLab. A quantidade ótima de DNA utilizada nas reações foi definida entre 200 e 300 ng por reação.

3.6 Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs)

3.6.1 PCR para o gene GAPDH

Para avaliar a eficiência das extrações do material genômico de todas as amostras extraídas, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene normalizador gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) bovino, utilizando oligonucleotídeos iniciadores segundo Pinheiro de Oliveira *et al.* (2013). Os iniciadores estão apresentados na Tabela 2. Foi utilizada uma solução *master mix* contendo 5,1μL de *Green GoTaq[®] Flexi Buffer* 5x (Promega, EUA), 1,9μL de cada iniciador (5pmol/μL - Sigma), 0,5μL de *dNTP mix* (10mM – Promega, EUA) 1,5μL de *MgCl₂* (10mM – Promega, EUA), 0,26μL de *Go Taq Flexi DNA Polymerase* (500U-Promega, EUA), 2,0 μL de DNA *template* e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies[®], EUA) para o volume final de 25μL. Como controle negativo foi utilizado apenas o *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 2,0 μL de água. A reação ocorreu no termociclador modelo *Veriti[™] 384 well* (*Applied Biosystems*, EUA) e consistiu em uma desnaturação inicial de 95°C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 95° C durante 30 segundos, hibridização de 54°C durante 30 segundos, extensão de 72° C durante 50 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 7 minutos, amplificando um fragmento de 709 pb. Os produtos da reação foram avaliados em gel de agarose, conforme descrito no item 3.5.

Tabela 2: Oligonucleotídeos iniciadores para o GAPDH

Oligonucleotídeo	Sequência	Fragmento
GAPDH F	GGTGATGCTGGTGCTGAGTA	709pb
GAPDH R	CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT	709pb

F= Forward e R= Reverse

Pinheiro de Oliveira *et al.*, 2013

3.6.2 PCRs para Detecção de BIV

Síntese de oligonucleotídeos iniciadores para o BIV

Uma sequência da região *pol* de parte do genoma do BIV foi obtida do *GenBank* (Acesso U34389.1) e com o auxílio do *software Primer3 Plus* (Untergrasser *et al.*, 2012) os iniciadores específicos foram concebidos e analisados. Os iniciadores foram denominados BIV F (5' CCCTCCAGGAATTAAGGAATG 3' nt 2327-2347) e BIV R (3' TCACTTTCTCTTCCTGGACCTT 5' nt 2712-2641).

A fim de aumentar a sensibilidade do teste, foi desenvolvido adicionalmente um oligonucleotídeo iniciador para a PCR *SemiNested* (PCR-SN). Uma sequência de parte do genoma *pol* do BIV foi obtida do *GenBank* (Acesso M32690.1) e foi alinhada com uma amostra de campo previamente sequenciada (MG046), utilizando o *software* de análise de sequências *MultiAlin* (CORPET, 1988). Subsequentemente, o iniciador interno específico foi concebido e analisado com o auxílio do *software Primer3 Plus* (Untergrasser *et al.*, 2012). O iniciador interno foi denominado BIV *SNested* (5' AGCCACCCAGACATCATGTT 3' nt 283-302).

3.6.3 PCR e PCR *Semi Nested* (PCR-SN) para BIV

A detecção do DNA proviral presente nas amostras de campo foi conduzida através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar parte da região conservada do gene *pol* do BIV, empregando os iniciadores BIV F e BIV R amplificando um fragmento de tamanho 385pb. A PCR foi executada em uma solução *master mix* contendo de 200 a 300 ng de DNA por amostra, 5,0µL de *Green GoTaq® Flexi Buffer 5x* (Promega, EUA), 2,0µL de cada iniciador (BIV F e BIV R, 10pmol/µL – Invitrogen, EUA), 0,5µL de dNTP *mix* (10mM – Promega, EUA) 1,5µL de MgCl₂ (10mM – Promega, EUA), 0,1µL de *Go Taq Flexi DNA Polymerase* (500U – Promega, EUA) e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA) para o volume final de 25µL. A reação foi submetida em termociclador modelo *Veriti™ 384 well* (*Applied Biosystems*, EUA) com desnaturação inicial de 94°C durante 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 94° C durante 40 segundos, hibridização de 54°C durante 40 segundos, extensão de 72° C durante 40 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 4 minutos. 20 µL do produto da reação foram avaliados em gel de agarose, conforme descrito no item 3.5.

A PCR *SemiNested* foi conduzida empregando o iniciador interno BIV *SNested* e o externo BIV R, amplificando um fragmento da região mais interna do gene de tamanho 154pb. Dois microlitros do produto amplificado na primeira reação (PCR) foram utilizados como *template* na segunda reação, em uma solução *master mix* constituída por 5,0µL de *Green GoTaq® Flexi Buffer 5x* (Promega, EUA), 2,0µL de cada iniciador (BIV *SNested* e BIV R, 10pmol/µL – Invitrogen, EUA), 0,5µL de dNTP *mix* (10mM – Promega, EUA) 1,5µL de MgCl₂ (10mM – Promega, EUA), 0,1µL de *Go Taq Flexi DNA Polymerase* (500U – Promega, EUA) e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA) para o volume final de 25µL. A reação foi conduzida em termociclador modelo *Veriti™ 384 well* (*Applied Biosystems*, EUA) com desnaturação inicial de 94°C durante 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C durante 30 segundos, hibridização de 58°C durante 30 segundos, extensão de 72° C durante 30 segundos, e uma extensão final de 72° C durante 4 minutos. 20 µL do produto da reação foram resolvidos em gel de agarose, conforme descrito no item 3.5.

3.7 Controle positivo

Como controle positivo para a PCR-SN foi utilizado um plasmídeo contendo parte do gene *pol*, gentilmente cedido pelo pesquisador Dr Charles Wood (*Center for Virology, University of Nebraska– Lincoln*). O plasmídeo foi cuidadosamente recortado do papel filtro e eluído em água ultrapura livre de DNase e RNase aquecida a 94°C e armazenado em temperatura ambiente por aproximadamente 18 horas. A quantidade e a qualidade do eluído foram estimadas no espectrofotômetro *NanoVue*[®] (GE Healthcare, EUA), e o mesmo foi armazenado a -20°C até o processamento.

3.8 Caracterização e otimização das PCRs para BIV

3.8.1 Otimização da temperatura de anelamento para a PCR-SN

A temperatura de anelamento ideal para amplificação dos fragmentos na PCR-SN foi realizada em gradiente, testando diferentes temperaturas (54, 56, 58, 60, 62 e 64° C). Dois microlitros dos clones MG079 e MG613 (gerados neste trabalho) foram utilizados como *template*, e a reação foi semelhante à descrita no item 3.6.3 (PCRs para detecção do BIV) diferindo apenas na aplicação de gradiente, nas temperaturas de anelamento. As condições da eletroforese foram semelhantes as do item 3.5, diferindo apenas na aplicação de 20 µL do produto amplificado no gel de agarose. Como controle negativo foi utilizado apenas o *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 2,0 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase.

3.8.2 Sensibilidade analítica da PCR-SN

Para a análise de sensibilidade da PCR-SN, um clone de amostra de campo positiva (MG079) purificado, teve sua concentração estimada através da leitura de densidade óptica em comprimento de onda de 260/280nm em espectrofotômetro *NanoVue*[®] (GE Healthcare, EUA). O número de cópias de DNA foi estimado de acordo com fórmula definida por Staroscik (2004), e o clone foi diluído em série decimal com água ultrapura livre de DNase e RNase de 10⁻⁴ a 10⁻¹³. Dois microlitros de cada diluição foram utilizados na reação para determinar a sensibilidade da PCR-SN. Todas as condições de reagentes e ciclagens foram idênticas às do item 3.6.3 e 20 µL do produto da reação foram resolvidos em gel de agarose, conforme descrito no item 3.5. Como controle negativo foi utilizado apenas o *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 2,0 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase.

3.8.3 Especificidade analítica dos iniciadores para o BIV

A fim de testar a especificidade dos iniciadores (BIV F, BIV R e BIV *SNested*) a PCR-SN foi testada frente a DNAs positivos de alguns vírus de bovinos atualmente pesquisados na rotina do DMVP. Foram utilizados DNAs positivos para: herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), vírus vaccínia (VACV), vírus da leucose bovina (BLV) e o herpesvírus bovino tipo 6 (BoHV- 6). Dois microlitros de cada DNA foram utilizados separadamente como *template*, e a reação foi semelhante à descrita no tópico 3.6.3, diferindo apenas na corrida eletroforética tanto da primeira quanto da segunda reação. Como controle positivo foi utilizado 2,0 µL de um clone de

amostra de campo positiva (MG079), e como controle negativo foi utilizado apenas o *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 2,0 μ L de água ultrapura livre de DNase e RNase.

A especificidade *in silico* dos iniciadores também foi avaliada, frente a outro lentivírus, o vírus da doença de Jembrana (JVD) através da análise de homologia, utilizando a ferramenta Primer-BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Esta ferramenta analisa a especificidade dos iniciadores em relação ao alvo desejado, promovendo alinhamentos com sequências depositadas em um banco próprio do NCBI (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.9 Clonagens

3.9.1 Amplificação do inserto do plasmídeo para obtenção de controle positivo

A fim de obter maior quantidade de controle positivo a partir do plasmídeo cedido pelo Dr Charles Wood, uma quantidade apropriada do inserto (19,25 ng) amplificado por PCR a partir deste plasmídeo, foi calculada e ligada a um vetor plasmidial (na proporção plasmídeo-inserto de 1:3) utilizando o pGEM®-T *Easy Vector Systems* (Promega, EUA), conforme instruções do fabricante. A reação de ligação foi incubada a 4°C *overnight* e posteriormente utilizada para transformar células competentes da linhagem DH5 α de *Escherichia coli* (Promega). Dez microlitros da reação de ligação foram adicionados a 100 μ L de *E. coli* DH5 α competente e incubados durante 20 minutos em gelo. Em seguida, a reação foi submetida a um choque térmico de 42°C por 50 segundos e imediatamente colocada em gelo durante 2 minutos. As bactérias transformadas foram cultivadas em 900 μ L de meio Luria-Bertani (LB) por uma hora à 37°C e agitação a 300 rpm. Após este período, 100 μ L das culturas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 μ g/ml), IPTG (0,1mM) e XGal (50 μ g/ml) e incubadas a 37°C *overnight*. Bactérias eficientemente transformadas são resistentes a ampicilina e crescem no meio contendo o antibiótico. O sucesso da clonagem interrompe a sequência codificadora da β -galactosidase, na região do gene *lacZ* do plasmídeo, sendo que aqueles que receberam o inserto contendo o DNA, formam colônias brancas por não metabolizarem o substrato X-gal e as que receberam o plasmídeo vazio, formam colônias azuis. Em seguida clones contendo os insertos foram crescidos em meio LB contendo ampicilina (100 μ g/ml) durante 6 horas. A extração do plasmídeo foi feita através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega, EUA) conforme instruções do fabricante. O novo plasmídeo subclonado (vetor pGEM), foi denominado BIVPOLMG, aliqüotado e armazenado separadamente a -20 e -80°C. Para confirmação da presença do inserto no plasmídeo, a PCR-SN descrita acima foi realizada.

3.10 Clonagem das sequências BIV-*pol* amplificadas das amostras de Campo

Os fragmentos de tamanho 385pb amplificados na PCR foram extraídos do gel e purificados através do Kit *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, EUA) segundo instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade dos fragmentos recuperados foram estimadas através da densidade óptica em comprimento de onda de 260/280 nm em espectrofotômetro *NanoVue®* (GE Healthcare, EUA). Uma quantidade apropriada de inserto foi calculada para cada amostra, e inserida no vetor plasmidial o pGEM®-T *and* pGEM®-T *Easy Vector Systems* (Promega, EUA) (na proporção plasmídeo-inserto de 1:3), conforme instruções

do fabricante. As condições de clonagem foram semelhantes as do tópico anterior, diferindo apenas na utilização de linhagens DH5 α e/ou JM109 (Promega, EUA), ambas de *Escherichia coli*.

3.11 Sequenciamento nucleotídico das amostras (*pol* - BIV) de campo clonadas em plasmídeo pGEM

Para confirmar a especificidade da PCR e PCR-SN para amplificação do BIV, foi realizada uma reação de sequenciamento através de uma solução *mix* contendo 100 ng de DNA purificado juntamente com 10 pmol de cada iniciador (BIV F ou BIV R; BIV F ou BIVSNested) e água ultrapura livre de DNase e RNase para o volume final de 7,5 μ L. Este *mix* foi encaminhado ao Laboratório de Genética Animal da EV-UFGM, e o sequenciamento dos *amplicons* foi realizado de forma automatizada através do sequenciador ABI310 *Genetic Analyser* com a utilização do reagente *BigDye Terminator v3.1* (*Applied Biosystems*, EUA) segundo os procedimentos operacionais padrão do laboratório.

3.12 Análise Molecular

A montagem dos *contigs* e definição das seqüências consenso de cada amostra foram realizadas utilizando o programa *SeqScape Versão 2.7* (*Applied Biosystems*, EUA), utilizando como referência a seqüência do genoma completo do BIV depositada no *GenBank* sob o número de acesso M32690.1. A edição, o alinhamento e a análise das seqüências consenso geradas foram feitas utilizando o programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando os valores padrão para alinhamento. As seqüências da região *pol* do BIV para comparação com as obtidas neste trabalho foram selecionadas a partir de busca no programa BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As seqüências selecionadas foram: R-29 (L04972.1), FL112 (L06524.1) e FL491 (L06525.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PCR GAPDH

A fim de avaliar a eficácia da extração de DNA, o material genético extraído da camada leucocitária do sangue de bovinos foi submetido a uma PCR convencional para detecção do gene GAPDH. O produto da amplificação deste gene resultou em uma única banda em gel de agarose, correspondente a um fragmento de 709 pb, como o esperado de acordo com os iniciadores descritos por Pinheiro de Oliveira *et al.*, (2013). Através da análise dos resultados obtidos, a detecção do gene GAPDH foi possível em 379 (96,93%) das 391 amostras testadas (Figura 3). Como o GAPDH é um gene constitutivo e estável, expresso em altos níveis em quase todos os tecidos e células (Senegaglia *et al.*, 2008), este resultado com alta porcentagem de amplificação sugere que a extração de DNA obteve sucesso, aumentando assim a confiabilidade dos testes e diminuindo a possibilidade de resultados falsos negativos por ausência ou degradação de DNA.

Tradicionalmente, os genes constitutivos mais utilizados como normalizadores em testes de PCR tem sido o GAPDH e β -actina (Watson *et al.*, 2007). Neste trabalho foi utilizado o GAPDH com alta taxa de detecção de DNA bovino, gerando apenas a banda específica e reduzindo a possibilidade de resultados falsos negativos na PCR-SN. Gonzalez e colaboradores (2000) utilizaram uma PCR que amplifica os genes β -lactoglobulina e κ -caseína para o controle do DNA genômico extraído, a partir de amostras de DNA bovino da camada leucocitária e do leite. Mesmo aplicando este controle, as mesmas amostras foram testadas para detecção do BIV, e não foi observada a presença de nenhum *amplicon*. Já Moody e colaboradores (2002) utilizaram a ubiquitina como gene normalizador e, embora os resultados não tenham sido apresentados, estes autores afirmaram que os iniciadores resultaram na amplificação do fragmento alvo, indicando que o DNA foi adequado para a análise da PCR realizada para o BIV.

Embora em estudos anteriores a confirmação da eficácia da extração de DNA tenha sido empregada utilizando outros genes normalizadores, o gene GAPDH se mostrou muito eficiente na amplificação de DNAs no presente trabalho, confirmando a especificidade dos iniciadores delineados por Pinheiro de Oliveira *et al.*, (2013) que obtiveram bons resultados através da combinação dos genes normalizadores β -actina e GAPDH.

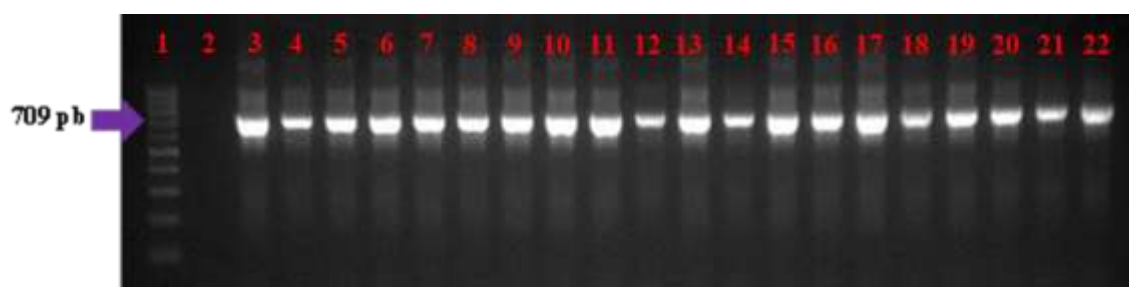


Figura 3: Amplificação do gene GAPDH do DNA das amostras extraídas da camada leucocitária de bovinos em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100pb. Canaleta 2: Controle negativo. Canaletas 3-22: Produto de PCR para amplificação do gene GAPDH. Este padrão de amplificação esteve presente em 96,93% das amostras.

4.2 Otimização da temperatura de anelamento

As temperaturas de anelamento ótimas para ambas as reações (PCR e PCR-SN) foram determinadas aplicando um gradiente de temperatura, usando como *template* as duas sequências clonadas em pGEM (MG079 e MG613) obtidas a partir de dois bovinos infectados, e amplificadas utilizando os iniciadores específicos para a região *pol* do BIV. As temperaturas ideais para a primeira e segunda reação foram definidas 54°C e 58° C, respectivamente. As temperaturas foram escolhidas visualmente através da análise das bandas de gel de agarose amplificadas. A figura 4 mostra o gradiente de temperaturas aplicado na segunda reação da PCR-SN, onde se observa que embora não tenha sido evidenciada a presença de bandas inespecíficas nos controles negativos em nenhuma das temperaturas de anelamento analisadas, optou-se por escolher a temperatura de 58°C devido a obtenção de bandas de intensidade mais uniforme dos produtos amplificadas.

Meas e colaboradores (2002) a fim de amplificar DNA proviral de parte da região *pol* do genoma do BIV, utilizaram através da PCR *nested*, temperaturas de anelamento semelhantes em amostras brasileiras. Embora nenhum teste de otimização de temperatura de anelamento tenha sido executado, a amplificação dos fragmentos de tamanho esperado proporcionaram um estudo da evidência molecular do vírus no Brasil. Dois anos depois, os mesmos autores também realizaram detecção molecular do vírus, através das mesmas condições, em rebanhos na Zâmbia.

Oliver (2007) afirmou que a temperatura de anelamento é um dos fatores mais críticos para o teste da PCR, auxiliando na determinação da sensibilidade e especificidade da reação. Diante disto, a PCR-SN desenvolvida neste trabalho oferece uma vantagem sobre alguns testes de PCR descritos anteriormente (Moody *et al.*, 2002; González *et al.*, 2008), pois buscou por meio da otimização, inferir a melhor temperatura para a amplificação dos fragmentos, diminuindo assim a possibilidade de subprodutos e, garantindo maior precisão e eficiência da reação.

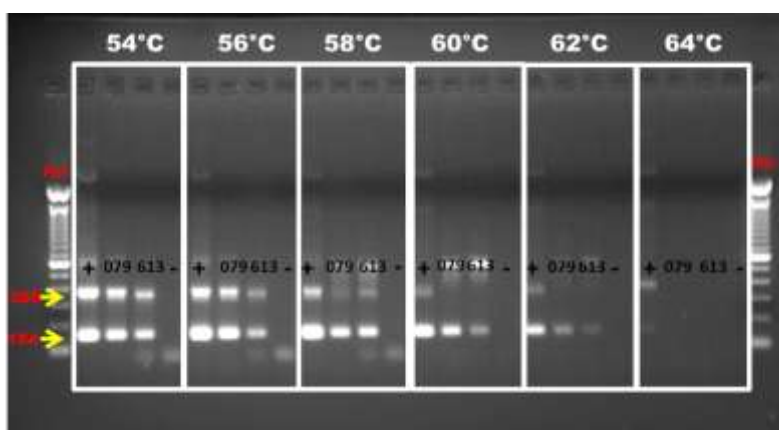


Figura 4: Gradiente de temperatura de anelamento ótima utilizando como *template* duas sequências clonadas (MG079 e MG613). Temperaturas utilizadas no gradiente: 54, 56, 58, 60, 62 e 64°C resolvidas em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0 mg/μL), em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) pH 8,3.

4.3 Especificidade analítica da PCR-SN

A especificidade dos iniciadores BIV F, BIV R e BIV *SNested* foram avaliadas através da técnica de PCR-SN, frente a DNA de diferentes vírus que infectam bovinos e que são frequentemente pesquisados na rotina do DMVP. Após análise em gel de agarose, estes resultados demonstraram que somente o controle positivo (clone MG079) amplificou o fragmento de tamanho 154pb, e não foram observados outros *amplicons* com fragmentos de tamanhos 385pb na primeira reação e nem de 154pb na segunda (figura 5), confirmando a especificidade dos iniciadores na reação.

Nadin-Davis e colaboradores (1993) determinaram alta especificidade da PCR utilizando plasmídeos e células infectadas que continham sequências clonadas de alguns lentivírus (virus

da anemia infecciosa equina (EIAV), vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e maed-visna vírus (MVV) e do vírus da leucose enzootica bovina (BLV), testando as regiões *gag* e *pol* do BIV. Nenhum *amplicom* inespecífico foi observado.

Embora neste trabalho a especificidade da PCR-SN foi avaliada apenas em DNAs bovinos atualmente pesquisados na rotina do DMVP, uma observação teórica também foi realizada a fim de assegurar através da análise de homologia, utilizando a ferramenta Primer-BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) se os iniciadores delineados neste trabalho apresentariam regiões homólogas com o JVD. Após a consulta, foi verificado que iniciadores não anelaram com nenhuma região do JVD, obtendo assim a especificidade dos iniciadores frente a este vírus. Existem poucos estudos analisando a especificidade do BIV através da PCR, e este estudo através da PCR-SN, clonagem e sequenciamento, apresentou alta especificidade, proporcionando uma confiabilidade extra na utilização desta técnica para a detecção do BIV em amostras brasileiras.

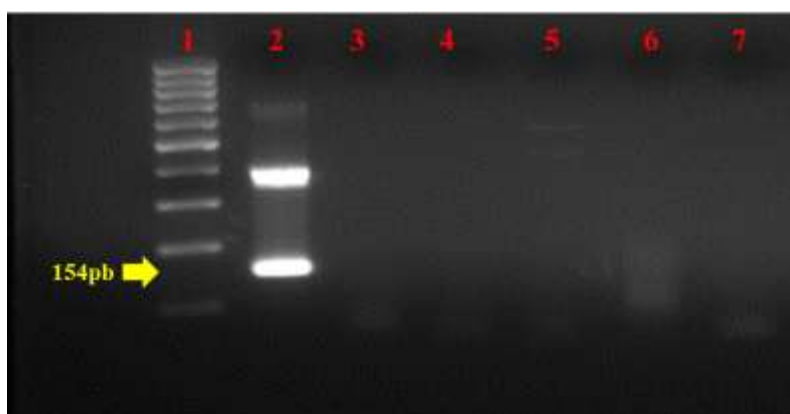


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1,5% apresentando a especificidade dos iniciadores utilizados na PCR-SN. Amostras de DNA de quatro vírus foram utilizadas como *template*. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: DNA BIV positivo. Canaleta 3: DNA IBR positivo. Canaleta 4: DNA Pox positivo. Canaleta 5: DNA BLV positivo. Canaleta 6: DNA BLHV positivo. Canaleta 7: Controle negativo.

4.4 Sensibilidade analítica da PCR-SN

Para determinação da sensibilidade da reação, ou seja, a menor quantidade de DNA que pode ser detectada por esta técnica, uma PCR-SN foi realizada utilizando uma alíquota de um clone de amostra de campo positiva como *template* (MG079), em diluições seriadas decimais, cujo número inicial de DNA foi de $7,42 \times 10^{13}$ cópias de DNA. Como observada na figura 6, a presença de fragmentos amplificados de tamanho 154pb foi visível até a canaleta 8, permitindo inferir que a sensibilidade de amplificação da região *pol* do BIV através da PCR-SN, ocorreu até a diluição 10^{-9} , correspondendo a um número de $7,42 \times 10^2$ cópias de DNA, demonstrando assim uma boa sensibilidade da reação.

A PCR-SN desenvolvida neste trabalho foi menos sensível do que a PCR *nested* proposta por González e colaboradores (2000), que encontraram um limite de detecção de 10 a 500 cópias/ μ L de DNA, fornecendo evidências que a PCR *nested* desenvolvida naquele trabalho, tem uma sensibilidade maior do que a de outros métodos anteriormente publicados. Estes autores testaram 367 amostras de DNA bovino para as regiões *gag*, *env* e *pol* através da PCR *nested* e não obtiveram nenhuma amplificação, porém a PCR-SN desenvolvida aqui, detectou 12,5% de animais positivos para o BIV, confirmados por sequenciamento, garantindo que com esta sensibilidade foi possível detectar DNA proviral em amostras brasileiras.

Patil e colaboradores (2003) utilizaram uma PCR-*nested* para detecção do BIV na Índia, e mesmo não testando a especificidade e nem a sensibilidade, este teste se mostrou eficaz na detecção do vírus a partir de amostras de campo. Suarez e Whetstone (1997) afirmam que, para ser considerado bom, um teste de diagnóstico deve ser específico, sensível, barato e fornecer resultados rapidamente. Embora haja poucos trabalhos relatando a padronização e a sensibilidade do PCR para a detecção do BIV, este teste ainda parece ser mais sensível que as técnicas sorológicas utilizadas (Bhatia *et al.*, 2013). No entanto, a ausência atual de um teste padrão ouro para o diagnóstico do BIV (Bhatia *et al.*, 2013), é um fator limitante para a determinação real da especificidade e da sensibilidade das diferentes PCRs (Suarez e Whetstone, 1997).



Figura 6: Avaliação da sensibilidade da PCR *Semi Nested* (PCR-SN) na detecção do gene *pol* do BIV, realizada através do clone MG79. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Clone MG079 puro. Canaletas 3-12: Diluições crescentes do clone correspondentes a 10^{-4} ; 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} ; 10^{-8} ; 10^{-9} ; 10^{-10} ; 10^{-11} ; 10^{-12} e 10^{-13} . Canaleta 13: Controle negativo.

4.5 PCR *Semi Nested*

O estudo do BIV encontra dificuldades pela ausência de um teste simples, rápido e eficaz, principalmente quando o número de animais estudados é grande. Nos últimos anos, a técnica de PCR se tornou uma ferramenta muito importante na detecção direta de patógenos, e por ser um método rápido e altamente sensível, pode detectar uma quantidade muito pequena de DNA em um intervalo de tempo relativamente curto (Takiuchi *et al.*, 2003).

Não existem estudos anteriores relatando a presença do BIV em Minas Gerais. Este é o primeiro relato da infecção no estado e o primeiro estudo promovido originalmente no Brasil. No presente trabalho, foi desenvolvida uma PCR *SemiNested* para o diagnóstico do BIV. Os

oligonucleotídeos iniciadores para detecção do vírus foram desenhados com base na região *pol* do genoma do BIV, identificada a partir da informação da sequência viral publicada para a estirpe americana R-29. Embora apenas um número relativamente pequeno de sequências publicadas esteja disponível até o momento, a previsão era de que, os iniciadores baseados a partir desta sequência poderiam ser utilizados com sucesso para a detecção do BIV na PCR-SN a partir de amostras brasileiras do vírus, já que esta região tem se mostrado conservada dentre os diferentes lentivírus descritos (Meas *et al.*, 1998; Flores, 2007).

Das 391 amostras testadas na PCR-SN, 49 (12,5%) amplificaram o fragmento alvo de tamanho 154bp e 342 (87,5%) não amplificaram (figura 7). É interessante constatar que embora não tenha sido detectado DNA proviral do BIV em 87,4% das amostras testadas, estas mesmas amostras foram anteriormente testadas para o gene constitutivo GAPDH, amplificando o fragmento esperado, reduzindo assim a possibilidade de resultados falsos negativos na PCR-SN.

Das 49 amostras positivas, quatro animais originários de dois rebanhos diferentes, apresentaram resultados onde duas mães e dois bezerros foram positivos para o vírus, sugerindo uma possível transmissão vertical. Embora o mecanismo de transmissão natural do BIV seja em grande parte desconhecido, estes resultados corroboram com estudos de Moody e colaboradores (2002), que comprovaram que o vírus pode ser transmitido por via uterina ou transplacentária, sugerindo ainda que possa haver transmissão por via lactogênica. Considerando que as mães foram positivas no teste de PCR-SN antes do parto, e que amostras de sangue de um destes bezerros foram coletadas logo após o nascimento, antes mesmo da primeira amamentação, uma transmissão por via uterina ou transplacentária pode ser sugerida, visto que este animal foi positivo em três testes consecutivos de PCR-SN e que não houve possibilidade de outro mecanismo de transmissão. Já as amostras de sangue do outro animal foram coletadas aproximadamente 12 horas após o nascimento, e considerando que durante este período este bezerro pode ter ingerido colostro, a infecção pode ter ocorrido por via lactogênica.

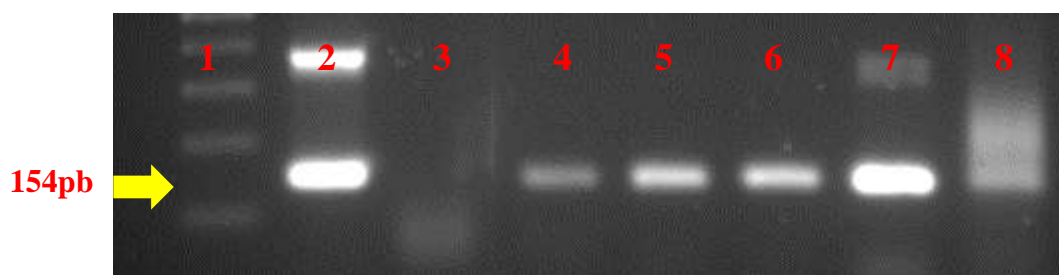


Figura 7: Gel de agarose 1,5% mostrando a amplificação do gene *pol* através da PCR-SN. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Controle positivo. Canaleta 3: Controle negativo. Canaletas 4-8: Amostras de DNA de bovinos.

Ao analisar as fazendas e os percentuais de infecção entre elas, observou-se que a fazenda II teve maior ocorrência da doença (21,4%) que pode ser justificada através das práticas de criação do gado, que é realizada de maneira semiextensiva, promovendo uma maior aglomeração dos animais. A aglomeração constante observada na fazenda II pode permitir através da troca de secreções e fluídos corporais, um mecanismo de transmissão horizontal, assim como outros fatores ambientais, como relatados no estudo de St Cyr Coats e colaboradores (1994) tais como a presença de insetos hematófagos, que podem proporcionar mecanicamente a transmissão do vírus. Snider e colaboradores (1997) afirmaram que o tempo no qual o gado permanece no pasto

e a proximidade entre eles, devido ao confinamento, tem sido o principal meio para elevar o mecanismo de transmissão do vírus no rebanho leiteiro, o qual pode ter auxiliado nas maiores porcentagens de animais infectados na fazenda II. Estudos experimentais que são realizados nos animais desta fazenda também podem ter contribuído para a transmissão por via iatrogênica, uma vez que podem ter sido compartilhadas agulhas e outros materiais utilizados em exames médicos, clínicos e reprodutivos. A fazenda III apresentou a menor porcentagem, apenas 1,05% de ocorrência da infecção por BIV. O sistema de criação nesta fazenda, realizado de maneira extensiva, permite que os animais fiquem livres no pasto natural, o que dificulta um pouco a disseminação do vírus no rebanho, justificando assim, a baixa ocorrência no local. Porém estas análises não são suficientes para permitir maiores inferências sobre a ocorrência do BIV em MG. A porcentagem e o total de animais positivos por fazenda testados através da PCR-SN estão demonstrados na tabela 3.

A indústria bovina na região da Zona da Mata e Central de Minas Gerais, é predominantemente composta de gado leiteiro, com um grande número de rebanhos dessas áreas. A proximidade ao RetroLab, a facilidade de acesso e o auxílio de profissionais experientes também foram fatores determinantes na escolha das regiões.

Tabela 3: Porcentagem e total de animais positivos por fazenda testados através PCR-SN. Fazendas I a IV (gado de leite) localizadas em duas regiões - Zona da Mata e Central - de Minas Gerais.

Fazenda n°	N° animais testados	BIV	Total (%)
I	163	21	12,9%
II	112	24	21,4%
III	95	1	1,05%
IV	21	3	14,3%
Total	391	49	12,5%

Estes resultados demonstraram que as regiões testadas no estado de Minas Gerais tiveram uma ocorrência média da doença de 12,5% muito similar à média encontrada por sorologia (11,7%), no trabalho de Meas e colaboradores (2002), que realizaram um estudo de soroprevalência e evidência molecular em duas regiões dos estados de Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. No entanto, estas amostras mesmo sendo brasileiras, foram processadas no Japão, e deste então nenhum outro estudo foi realizado com amostras obtidas no país.

Na utilização da PCR, as regiões gênicas mais comumente utilizadas para detecção do BIV são a *env* e a *pol* (Nadin-Davis *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1997; Meas *et al.*, 1998; Gradil *et al.*, 1999; Meas *et al.*, 2000a; Meas *et al.*, 2000b; Orr *et al.*, 2003; Momtaz *et al.*, 2010), porém neste trabalho foi utilizada apenas a região *pol* devido ao fato de ser uma região altamente conservada entre os lentivírus (Meas *et al.*, 1998) e ser a mais utilizada na bibliografia consultada. Inicialmente neste trabalho, foram feitas tentativas utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores descritos no trabalho de Meas e colaboradores (1998), que utilizaram a PCR *nested* para detectar parte do gene *pol* do BIV em amostras de sangue e leite a partir animais soropositivos no *Western Blot*.

Mesmo com todas as condições descritas, testando as 391 amostras, não foi obtido sucesso na amplificação específica, gerando bandas inespecíficas. Porém, por acreditar em uma baixa sensibilidade desta PCR e que Minas Gerais poderia ser uma região com ocorrência da doença, foi feita a construção de novos oligonucleotídeos para a PCR-SN.

Ao analisar a ocorrência e distribuição mundial apresentadas na tabela 4 percebe-se que esse percentual também foi maior do que os valores observados por detecção direta através da PCR na Índia (8,8%), em inquéritos sorológicos na Holanda (1,4%), Itália (2,5%), França (4%), Polônia (4,9%), Reino Unido (5,5%), Canadá (5,5%) e Alemanha (6,6%) (Patil *et al.*, 2003; Horzinek *et al.*, 1991; Cavirani *et al.*, 1998; Polack *et al.*, 1996; Rola-Luszczak *et al.*, 2011; Scobie *et al.*, 2001; McNab *et al.*, 1994; Muluneh, 1994). Moderadamente semelhante aos estudos de sorologia realizados na Zâmbia (11,4%), Japão (11,7%), Argentina (12%), Turquia (12,3%) e Nova Zelândia (13,5%) (Meas *et al.*, 2004; Meas *et al.*, 1998; González *et al.*, 2008; Meas *et al.*, 2003; Horner, 1991). Inferior ao percentual do Paquistão (15,8% em bovinos e 10,3% em búfalos), Indonésia (18%), Estados Unidos (20%), Camboja (26,3% em bovinos e 16,7% em bubalinos) e Coreia (34%) (Meas *et al.*, 2000a; Barboni *et al.*, 2001; Cockerell *et al.*, 1992; Meas *et al.*, 2000b; Cho *et al.*, 1999.). Países como os Estados Unidos apresentam um percentual significativamente maior que o deste estudo, com 50% de infecção através de testes sorológicos (Amborski *et al.*, 1989). Na comparação, o Irã também apresenta um elevado percentual (60% e 64% de detecção através da PCR) (Brujeni *et al.*, 2010; Tajbakhsh *et al.*, 2010) e foi observado em um estudo na Venezuela o maior índice de infecção pelo BIV, com cerca de 66% de animais infectados (Walder *et al.*, 1995).

Ao observar a tabela 4, percebe-se que a doença ocorre com maior frequência na Europa e na Ásia. O gado brasileiro é originado da Europa e da Índia, e, uma vez que os bovinos importados já poderiam estar infectados com o BIV, pode haver evidências de que o vírus da imunodeficiência bovina já esteja presente no rebanho brasileiro há muito tempo, porém, só agora foram realizados estudos de detecção.

A maioria dos estudos envolvendo a ocorrência do BIV foi realizada através de detecções sorológicas, mas a implementação de testes de detecção direta, devidamente padronizados, garantem uma maior acurácia nos resultados para detecção de BIV nos rebanhos (Tajbakhsh *et al.*, 2010). Estudos de Jacobs e colaboradores (1998) indicaram discordância entre a detecção sorológica e a molecular do BIV, onde a detecção por PCR apresentou maior sensibilidade, fornecendo evidências de que a PCR tem uma sensibilidade maior do que outros métodos publicados (Gonzalez *et al.*, 2000). Diante disto, uma técnica de detecção direta é necessária ao diagnóstico da infecção, uma vez que o DNA proviral do BIV pode ser detectado mesmo em animais soronegativos, indicando que os falsos negativos podem ser potenciais disseminadores da doença se somente testes sorológicos forem utilizados. Anteriormente, lâminas estavam comercialmente disponíveis para o teste de IFA (*Veterinary Medical Research & Development - VMRD, Inc., Pulman, WA, USA*), porém, só foram utilizados no trabalho de González e colaboradores (2008) antes de serem retirados do mercado.

Tabela 4: Ocorrência e distribuição mundial do BIV

CONTINENTES	PAÍSES	MÉTODO	OCORRÊNCIA	ANIMAL	REFERÊNCIA
Europa	Holanda	IFA	1,4%	Bovino	Horzinek <i>et al.</i> , 1991
Europa	Itália	IFA	2,5%	Bovino	Cavirani <i>et al.</i> , 1998
Europa	França	WB	4,0%	Bovino	Polack <i>et al.</i> , 1996
Europa	Polônia	ELISA	4,9%	Bovino	Rola-Luszczak <i>et al.</i> , 2011
Europa	Reino Unido	ELISA	5,5%	Bovino	Scobie <i>et al.</i> , 2001
América do Norte	Canadá	WB	5,5%	Bovino	McNab <i>et al.</i> , 1994
Europa	Alemanha	ELISA	6,6%	Bovino	Muluneh, 1994
Ásia	Índia	PCR	8,8%	Bovino	Patil <i>et al.</i> , 2013
Ásia	Paquistão	WB	10,3%	Búfalo	Meas <i>et al.</i> , 2000a
África	Zâmbia	WB	11,4%	Bovino	Meas <i>et al.</i> , 2004
Ásia	Japão	WB	11,7%	Bovino	Meas <i>et al.</i> , 1998
América do Sul	Brasil	WB	11,7%	Bovino	Meas <i>et al.</i> , 2002
América do Sul	Argentina	ELISA	12,0%	Bovino	González <i>et al.</i> , 2008
Ásia	Turquia	WB	12,3%	Bovino	Meas <i>et al.</i> , 2003
América do Sul	Brasil	PCR	12,5%	Bovino	Rodrigues, 2014
Oceânia	Nova Zelândia	WB	13,5%	Bovino	Horner, 1991
Ásia	Paquistão	WB	15,8%	Bovino	Meas <i>et al.</i> , 2000a
Ásia	Cambodja	WB	16,7%	Búfalo	Meas <i>et al.</i> , 2000b
Ásia	Indonésia	ELISA	18,0%	Bovino	Barboni <i>et al.</i> , 2001
América do Norte	Estados Unidos	ELISA	20,0%	Bovino	Cockerell <i>et al.</i> , 1992
Ásia	Cambodja	WB	26,3%	Bovino	Meas <i>et al.</i> , 2000b
Ásia	Coréia	WB	34,0%	Bovino	Cho <i>et al.</i> , 1999
América do Norte	Estados Unidos	IFA	50,0%	Bovino	Amborski <i>et al.</i> , 1989
Ásia	Irã	PCR	60,0%	Bovino	Brujeni <i>et al.</i> , 2010
Ásia	Irã	PCR	64,0%	Bovino	Tajbakhsh <i>et al.</i> , 2010
América do Sul	Venezuela	Sorologia	66,0%	Bovino	Walder <i>et al.</i> , 1995

WB = Western Blot PCR = Reação em cadeia da polimerase IFA = Imunofluorescência indireta ELISA = ensaio imunoenzimático

A fim de evitar erros e controvérsias na padronização da PCR-SN, a concentração da agarose, espessura dos géis de eletroforese, concentração da solução-tampão usada na eletroforese, quantidade do produto de PCR-SN inserido no gel, tempo, amperagem e voltagem da corrida eletroforética, solução de brometo de etídio e o padrão de tamanho molecular foram padronizados e mantidos constantes. Também, a visualização e a captura das imagens dos géis foram efetuadas utilizando o mesmo equipamento e os mesmos parâmetros. Todos estes passos foram importantes e cruciais para a técnica da PCR-SN, apresentando uma metodologia confiável e reprodutível para a detecção do BIV em bovinos de Minas Gerais.

4.6 Clonagem dos fragmentos de interesse

Neste trabalho, as sequências nucleotídicas dos DNAs plasmidiais de 6 prováveis clones positivos (todos das Fazenda II), extraídos através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems* (Promega) foram inicialmente considerados de boa qualidade e adequados para análises de sequenciamento. A presença e o tamanho dos insertos confirmaram o sucesso das etapas de clonagem e transformação bacteriana (figura 8). As construções nos vetores de clonagem foram denominadas de MG046, MG079, MG613, MG617, MGRA e MGTO.

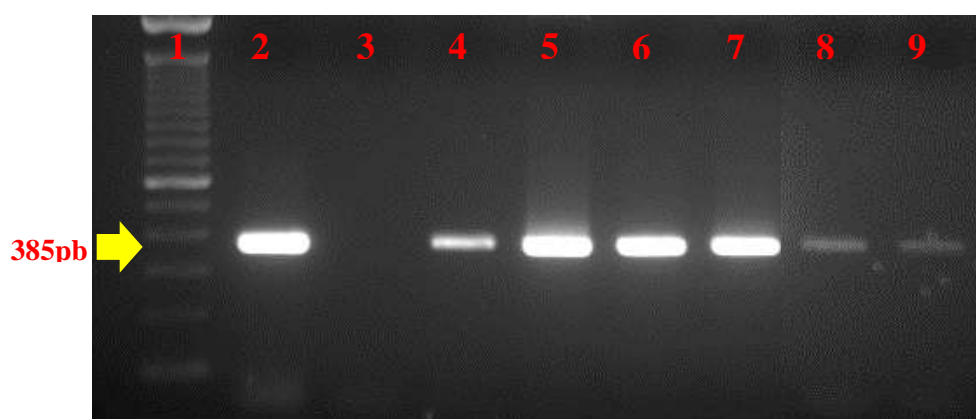


Figura 8: Fragmentos *pol* clonados em plasmídeos pGEM a partir de amostras de campo do BIV isolada de bovinos em Minas Gerais. Canaleta 1: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. Canaleta 2: Controle positivo. Canaleta 3: Controle negativo. Canaleta 4: Clone MG46. Canaleta 5: Clone MG079. Canaleta 6: Clone MG613. Canaleta 7: Clone MG617. Canaleta 8: Clone MGRA. Canaleta 9: Clone MGTO.

4.7 Análises moleculares

Análise da sequência de nucleotídeos

Cinco dos seis clones obtidos das sequências nucleotídicas de amostras de campo positivas na PCR foram sequenciados utilizando os iniciadores (BIV F e BIV R) seguindo os procedimentos operacionais padrão do laboratório de Genética da EV-UFGM. As sequências do fragmento *pol* do BIV, foram analisadas utilizando o programa MEGA versão 5.0 (Tamura *et al.*, 2011), e submetidas ao processo de buscas por similaridade através do software público BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) onde foram alinhadas com algumas sequências disponíveis, como a americana R-29 e as sequências dos isolados da Flórida FL112 e FL491.

As sequências obtidas neste trabalho confirmam a identidade dos genes de acordo com a alta similaridade encontrada com sequências *pol* BIV já depositadas no *GenBank*, e mostraram alta similaridade (99%) com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus, a cepa R-29. Esse fato permitiu concluir a origem viral do inserto e o sucesso obtido na clonagem. De modo geral os clones sequenciados apresentaram pequenas variações entre si, que podem ser atribuídas a erros de leitura ou mesmo a erros gerados durante a marcação para o sequenciamento ou na amplificação. No entanto, os plasmídeos destes seis clones apresentaram

os genes de interesse, que tiveram sua presença confirmada através da PCR e subsequentemente na eletroforese em gel de agarose.

A pequena diferença de similaridade entre o produto clonado das amostras de campo e a cepa R-29, provavelmente, originou-se por erro durante o processo de extensão da cadeia nucleotídica na PCR-SN pela enzima Taq DNA polimerase, o que pode ter produzido deleção de algumas bases nitrogenadas e/ou mutação de outras. Outra possível explicação se deve a possíveis alterações na sequência de nucleotídeos que podem surgir naturalmente como resultado da infidelidade das polimerases, que podem incorporar nucleotídeos incorretos durante a replicação do genoma viral, gerando assim esta pequena diferença de similaridade (Flores, 2007).

Meas e colaboradores (2002) comprovaram que as amostras brasileiras amplificadas da região *pol* do BIV também apresentaram alta similaridade com o isolado R-29. Devido à alta conservação do gene, estes autores optaram por não incluir no banco de dados do BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) as sequências de diferentes amostras brasileiras. Este fato faz com que as sequências brasileiras sejam as primeiras a serem depositadas no banco de genomas, proporcionando assim, além do reconhecimento oficial, oportunidade de novas comparações, tanto com amostras brasileiras de outros estados como de outros países, instigando novas investigações sobre a epidemiologia molecular do vírus e de possíveis cepas circulantes no país.

A figura 9 mostra a comparação das sequências provirais dos fragmentos da região *pol* amplificados a partir da PCR-SN com as sequências obtidas do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As amostras MG079 e MG613 apresentaram substituições de nucleotídeos em três posições, as quais foram ausentes em todas as outras amostras, nacionais e internacionais, assim como na de referência.

A homologia de sequências obtidas através da PCR convencional, para amplificação da região *pol* do BIV, foi analisada por Suarez e colaboradores (1995). Ao compará-las com um clone molecular da cepa R-29, estes autores encontraram alta similaridade entre as sequências, onde apenas uma substituição de base foi encontrada, e, ao ser traduzida para proteína, gerou uma mutação silenciosa. Meas e colaboradores (1998) encontraram resultados semelhantes ao amplificarem a mesma região por PCR *nested* em amostras japonesas, e a mudança de uma única base, em uma das cinco amostras testadas, gerou apenas uma mutação silenciosa, confirmando assim, a alta conservação do gene no vírus.

A fim de avaliar se as mudanças na sequência dos nucleotídeos encontrados neste trabalho provocariam alterações de aminoácidos, os fragmentos sequenciados foram traduzidos através da ferramenta BLASTx (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os dados demonstraram que não houve substituições de aminoácidos nas posições da troca de base e que, mesmo com esta pequena modificação, o aminoácido não se alterou, ocorrendo uma mutação silenciosa no gene, não implicando na alteração da sequência de aminoácidos da proteína, corroborando com resultados anteriores. Como a região *pol* é responsável pela expressão de genes vitais que promovem a replicação viral era de se esperar que fossem observadas poucas alterações na sequência estudada e que caso ocorressem resultassem em mutações silenciosas.

BIV_Genoma_Pro_Completo	T T A A C T G C A A T A G A T A T A A A A G A T G C C T A C T T T A C T A T C C C T T T A C A T G A G G A C T T T A G A C C G T T T A C A G C C T T C T C T	[78]
MG046.	.	[78]
MG079.	.	[78]
MG613.	.	[78]
MG617.	.	[78]
MGTO.	.	[78]
BIV_R29_pol_vif_env	.	[78]
FL112	.	[78]
FL491	.	[78]
BIV_Genoma_Pro_Completo	G T A G T C C C T G T A A A T C G A G A A G G A C C T A T A G A G A G G T T C C A G T G G A A T G T T C T A C C A C A A G G A T G G G T A T G T A G C C C T	[156]
MG046.	.	[156]
MG079.	.	[156]
MG613.	.	[156]
MG617.	.	[156]
MGTO.	.	[156]
BIV_R29_pol_vif_env	.	[156]
FL112	.	[156]
FL491	.	[156]
BIV_Genoma_Pro_Completo	G C C A T T T A T C A G A C T A C C A C C C A G A A G A T T A T A G A A A A C A T T A A A A A G A G T C A C C C A G A T G T C A T G T T G T A T C A A T A T	[234]
MG046.	.	[234]
MG079.	.	[234]
MG613.	.	[234]
MG617.	.	[234]
MGTO.	.	[234]
BIV_R29_pol_vif_env	.	[234]
FL112	.	[234]
FL491	.	[234]
BIV_Genoma_Pro_Completo	A T G G A T G A T T T G T T G A T T G G G T C T A A T A G G G A T G A T C A T A A G C A A A T A G T G C A G G A A A T C A G G G A T A A G T T A G G A T C A	[312]
MG046.	.	[312]
MG079.	.	[312]
MG613.	.	[312]
MG617.	.	[312]
MGTO.	.	[312]
BIV_R29_pol_vif_env	.	[312]
FL112	.	[312]
FL491	.	[312]
BIV_Genoma_Pro_Completo	T A T G G T T T C A A G A C T C C A G A T G A A A A G G T C C A G G A A G A	[350]
MG046.	.	[350]
MG079.	.	G A [350]
MG613.	.	G . [350]
MG617.	.	[350]
MGTO.	.	[350]
BIV_R29_pol_vif_env	.	[350]
FL112	.	[350]
FL491	.	[350]

Figura 9: Comparação das sequências provirais dos fragmentos da região *pol* amplificados a partir da PCR-SN. As sequências foram derivadas dos clones de amostras de campo MG046, MG079, MG613, MG617 e MGTO. Estas sequências foram alinhadas e comparadas com as sequências publicadas do genoma completo proviral do BIV, do isolado R-29 e dos isolados da Flórida FL112 e FL491. Os pontos indicam bases idênticas. Letras indicam substituições.

5. CONCLUSÕES

A PCR *semi-nested* para a detecção de BIV desenvolvida neste trabalho se mostrou eficiente na detecção do BIV com boa sensibilidade e especificidade analíticas.

O BIV está presente em bovinos das regiões Zona da Mata e Central do estado de Minas Gerais com uma ocorrência média de 12,5%, porém como poucos rebanhos foram avaliados, um estudo com um maior e mais representativo número de amostras do estado deverá ser realizado para a determinação da prevalência desta infecção.

Os lentivírus são em geral transmitidos horizontalmente e verticalmente. Embora a rota e o mecanismo de transmissão do BIV ainda sejam amplamente desconhecido, este trabalho apresentou evidências de que o BIV pode ser transmitido de mãe para filho através das vias uterina ou transplacentária.

As análises das sequências de nucleotídeos da região gênica *pol* de amostras brasileiras do BIV mostraram alta similaridade com as amostras descritas nos Estados Unidos: R-29, F112 e FL491.

Epidemiologicamente, este estudo fornece dados iniciais informando que a presença do BIV no Brasil pode ser considerada como um fator de risco para a saúde das populações de bovinos, e um potencial agente causador de doença crônica em bovinos, como relatada em outros países ao redor do mundo. O vírus pode estar presente em outras regiões do país, porém, devido à escassez de dados, estudos mais detalhados são necessários para confirmar a ocorrência e o papel do BIV nos rebanhos bovinos brasileiros. Desta forma, o estudo, a identificação e o diagnóstico da infecção do BIV em bovinos tornam-se estritamente necessários para o entendimento de doenças ainda não bem esclarecidas e que contribuem de forma negativa para a economia pecuária do país.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBORSKI, G. F.; LO, J.; SEGER, C. L. Serological detection of multiple retroviral infections in cattle: bovine leukemia virus, bovine syncytial virus and bovine visna virus. *Vet. Microbiol.*, v. 20, p. 247-253, 1989.
- ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; BLOYD, H. *et al. Medicina Bovina: Doença e Criação de Bovinos*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 1080p.
- BARBONI, P.; THOMPSON, I.; BROWNLIE, J. *et al.* Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. *Vet. Microbiol.*, v. 80, p. 313-327, 2001.
- BELLOCK, C.; POLACK, B.; SCHWARTZ-CORNIL, I. *et al.* Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. *Vet. Res.*, v. 27, p. 395-402, 1996.
- BHATIA, S.; PATIL, S. S.; SOOD, R. Bovine Immunodeficiency virus: a lentiviral infection. *Indian J. Virol.*, v. 24, n. 3, p. 332-341, 2013.
- BRAUN, M. J.; LAHN, S.; BOYD, A. L. *et al.* Molecular cloning of biologically active proviruses of bovine immunodeficiency-like virus. *Virology*, v. 167, p. 515-523, 1988.
- BRUJENI, G. K.; POORBAZARGANI, T., T.; NADIN-DAVIS, S. *et al.* Bovine Immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v. 4, n. 9, p. 576-579, 2010.
- CAVIRANI, S.; DONOFRIO, G.; CHIOCCO, D. *et al.* Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, v.37, p.147-157, 1998.
- CHO, K. O.; MEAS, S.; PARK, N. Y. *et al.* Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus in dairy and beef cattle in Korea. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 61, p. 549-551, 1999.
- COCKERELL, G. L.; JENSEN, W. A.; ROVNAK, J. *et al.* Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattle herd. *Vet. Microbiol.*, v. 31, p. 109-116, 1992.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- CORREDOR, A. G.; ST-LOUIS, M. C.; ARCHAMBAULT, D. Molecular and biological aspects of the bovine immunodeficiency virus. *Curr. HIV Res.*, v. 8, p. 2-13, 2010.
- DAFFNER J & SCORTTI M. Bovine immunodeficiency virus. *Arch. Med. Vet.*, v. 29, n. 1, p.5-11, 1997.
- DESPOIT, M.; MCLACHLAN, S. The Bovine Lentiviruses: Pathogenesis and Cell Tropism. Norfolk: Caister Academic Press, 2010. 309 - 310.
- FORMAN, A. J.; GIBSON, C. A.; RODWELL, B. J. Serological evidence for the presence of bovine lentivirus infection in cattle in Australia. *Aust. Vet. J.*, v. 69, p. 337, 1992.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. 888p.

GONDA, M. A.; LUTHER, D. G.; FONG, S. E. *et al.* Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and host interactions. *Virus Res.*, v. 32, p. 155-181, 1994.

GONZALEZ, G. C.; JOHNSTON, J. B.; NICKEL, D. D. *et al.* Very low prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in western Canadian cattle. *Can. J. Vet. Res.*, v. 65, p. 73-76, 2000.

GONZÁLEZ, E. T.; LICURSI, M.; VILA ROZA, V. *et al.* Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: Serological survey in Argentina. *Res. Vet. Sci.*, v. 85, p. 353-358, 2008.

GRADIL, C. M.; WATSON, R. E.; RENSHAW, R. W. *et al.* Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. *Vet. Microbiol.*, v. 70, p. 21-31, 1999.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, v. 41, p.95-98, 1999.

HIDALGO, G.; FLORES, M.; BONILLA, J. A. Detection and isolation of bovine immunodeficiency-like virus (BIV) in dairy herds of Costa Rica. *Zbl. Vet. Med. B.*, v. 42, n. 3, p. 155-161, 1995.

HORNER, G. W. Serologic evidence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine syncytial virus in New Zealand. *Surveillance*, v. 18, n. 2, p. 9, 1991.

HORZINEK, M.; KELDERMANS, L.; STUUMAN, T. *et al.* Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. *J. Gen. Virol.*, v. 72, p. 2923-2928, 1991.

JACOBS, R. M.; JEFFERSON, B. J.; SUAREZ, D. L. Prevalence of bovine immunodeficiency-like virus in bulls as determined by serology and proviral detection. *Can. J. Vet. Res.*, v. 62, p. 231-233, 1998.

McNAB, W. B.; JACOBS, R. M.; SMITH, H. E. A serological survey for bovine immunodeficiency-like virus in Ontario dairy cattle and association between test results, production records and management practices. *Can. J. Vet. Res.* v. 58, p. 36-41, 1994.

MEAS, S.; KABEYA, H.; YOSHIHARA, S. *et al.* Seroprevalence and Field Isolation of Bovine Immunodeficiency Virus. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 60, p. 1195-1202, 1998.

MEAS, S.; SUGIMOTO, C.; BAKHSH, M. *et al.* Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62, p. 329-331, 2000a.

MEAS, S.; OHASHI, K.; TUM, S. *et al.* Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 62, p. 779-781, 2000b.

MEAS, S.; RUAS, J. F.; USUI, T. *et al.* Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *Jpn. J. Vet. Res.*, v. 50, p. 9-16, 2002.

MEAS, S.; YILMAZ, Z.; USUI, T. *et al.* Evidence of bovine immunodeficiency virus in cattle in Turkey. *Jpn. J. Vet. Res.*, v. 51, p. 3-8, 2003.

MEAS, S.; NAKAYAMA, M.; USUI, T. *et al.* Evidence for bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia. *Jpn. J. Vet. Res.*, v. 52, p. 3-8, 2004.

MOODY, C. A.; PHARR, G. T.; MURPHEY, J. *et al.* Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 14, p. 113-119, 2002.

MOMTAZ, H.; TAJBAKSH, E.; MOMENI, M. Cloning and phylogenetic analysis of bovine immunodeficiency virus *env* gene in Iranian isolates. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 4, n. 6, p. 492-496, 2010.

MULUNEH, A. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany. *Zbl. Vet. Med. B*, v. 41, p. 679-684, 1994.

NADIN-DAVIS, S. A.; CHANG, S. C.; SMITH, H. *et al.* Detection of bovine immunodeficiency-like virus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, v. 42, p. 323-336, 1993.

NCBI. NCBI BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: fev. 2014.

OLIVER, D. Polymerase Chain Reaction and Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. In: ZANDER, D. S.; POPPER, H. H.; JAGIRDAR, J.; HAQUE, A. K.; CAGLE, P. T.; BARRIOS, R. *Molecular Pathology of Lung Diseases*. New York: Springer Science Business Media, 2007. v. 1, cap. 9, 83-96.

ONUMA, M.; KOOMOTO, E.; FURUYAMA, H. *et al.* Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*, v. 5, p. 1009-1015, 1992.

ORR, K. A.; O' REILLY, K. L.; SCHOLL, D. T. Estimation of sensitivity and specificity of two diagnostics testes for bovine immunodeficiency virus using Bayesian techniques. *Prev. Vet. Med.*, v. 61, n. 2, p.79-89, 2003.

PATIL, S.S.; PATTNAIK, B.; MISHRA, N. *et al.* Detection of proviral genomic sequence of bovine immunodeficiency virus in Indian cattle. *Curr. Sci.*, v. 84, n. 4, 2003.

PINHEIRO de OLIVEIRA, T. F.; FONSECA JR, A. A.; CAMARGOS, M. F. *et al.* Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*, v. 41, p. 407-414, 2013.

POLACK, B.; SCWARTZ, I.; BERTHELEMY, M. *et al.* Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France. *Vet. Microbiol*, v. 48, p. 165-173, 1996.

- RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. *Retroviridae*. In: FLORES, E. Virologia Veterinária. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Cap. 31, p. 808-837.
- ROLA-LUSZCZAK, M.; KOZACZYNSKA, B.; KUZMAK, J. Serological survey for bovine immunodeficiency virus in dairy cattle from Poland. *J. Vet. Sci.*, v. 14, n. 4, p. 579-583.
- SCOBIE, L.; VENABLES, C.; SAYERS, A. R.; WEIGHTMAN, S. *et al.* Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. *Vet. Rec.*, v. 149, p. 459-460, 2001.
- SENEGAGLIA, A. C.; BROFMAN, P. R.; AITA, A. M. *et al.* In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, v. 23, n. 4, p. 467-473, 2008.
- SNIDER, T. G.; LUTHER, D. G.; JENNY, B. F. *et al.* Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 19, p.117-131, 1996.
- STAROSCIK, A. Calculator for determining the number of copies of a template. Disponível em: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. 2004. Acesso em: fev. 2014.
- SUAREZ, D. L.; VAN DER MAATEN, M. J.; WOOD, C. *et al.* Isolation and Characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. *J. Virol.*, v. 67, n. 8, p. 5051-5055, 1993.
- ST CYR COATS, K.; PRUET, S. B.; NASH, J. W. *et al.* Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 42, p. 181-189, 1994.
- ST-LOUIS, M. C.; COJOCARIU, M.; ARCHAMBAULT, D. The molecular biology of bovine immunodeficiency virus: a comparison with other lentiviruses. *Anim. Health Res. Rev.*, v. 5, p. 125-143, 2004.
- ST-LOUIS, M. C.; ABED, Y.; ARCHAMBAULT, D. The bovine immunodeficiency virus: cloning of a tat/rev cDNA encoding a novel Tat protein with enhanced transactivation activity. *Arch. Virol.*, v. 150, p. 1529-1547, 2005.
- SU, Y.; QIAO, W.; GUO, T. *et al.* Microtubule-dependent retrograde transport of bovine immunodeficiency virus. *Cell. Microbiol.*, v.12, p.1098-1107, 2010.
- TAJBAKHSH, E.; BORUJENI, G. N.; MOMTAZ, H. *et al.* Molecular prevalence for bovine immunodeficiency virus infection in Iranian cattle population. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 4, n. 12, p. 1199-1202, 2010.
- TAKIUCHI, E. ; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. *et al.* Standardization of a polymerase chain reaction (Semi Nested-PCR) to detect bovine herpesvirus type 1 in aborted fetus and semen from naturally infected cattle. *Semin-Cien. Agrar.*, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T. *et al.* Primer3: new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*, v. 40, n. 15, e. 115, 2012.
- VAN DER MAATEN, M. J.; BOOTH, A. D.; SEGAR, C. L. Isolation of virus from cattle with persistent lymphocytosis. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 49, p. 1649-1657, 1972.

WALDER, R.; KALVATCHEV, Z.; TOBIN, G. L. *et al.* Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies. *Res. Virol.*, v. 146, p. 313–323, 1995.

WATSON, S.; MERCIER, S.; BYE, C. *et al.* Determination of suitable housekeeping genes for normalization of quantitative real time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses. *Virol. J.*, v. 4, p. 130, 2007.

YIN, H.; LI, Y.; ZOU, Z. *et al.* Inactivation of bovine immunodeficiency virus by photodynamic therapy with HMME. *Chin. Opt. Lett.*, v. 6, n. 12, p. 944-946, 2008.

ZHANG, S.; TROYER, D. L.; KAPIL, L. *et al.* Detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus in bovine tissues by polymerase chain reaction (PCR) and PCR *in situ* hybridization. *Virology*, v. 236, p. 249-257, 1997.

ANEXO 1: Protocolo de extração de DNA de sangue e fluidos corporais.



Purificação de DNA de Sangue ou Fluidos Corporais

Instruções:

- Buffer AW1 = Antes de usar pela primeira vez, adicionar a quantidade necessária de etanol (96-100%) – vide frasco
- Buffer AW2 = idem Buffer AW1
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (250) = Pipetar 5,5ml do solvente de Protease no frasco contendo QIAGEN protease liofilizado, conforme o rotulo.

Procedimentos:

- 1) Pipetar 20µl de QIAGEN Protease (ou Proteinase K) em um tubo de microcentrífuga de 1,5ml;
- 2) Adicionar 200µl de amostra no tubo de microcentrífuga.
-Se o volume da amostra for menor que 200µl, adicionar volume adequado de PBS.
- 3) Adicionar 200µl de tampão AL na amostra. Vortetizar por 15 segundos.
- Se o volume da amostra for superior a 200µl, aumentar a quantidade de QIAGEN Protease e tampão AL proporcionalmente. Ex.: 400µl de amostra = 40µl QIAGEN e 400µl tampão AL.
- Não adicionar QIAGEN Protease diretamente no tampão AL.
- 4) Incubar a 56° por 10 minutos;
- 5) Centrifugar o tubo de microcentrífuga de 1,5ml para remover as gotículas da tampa;
- 6) Adicionar 200µl de etanol (96-100%) na amostra. Vortetizar por 15 segundos. Centrifugar novamente para remover as gotículas da tampa.
-Se o volume da amostra for maior que 200µl, aumentar a quantidade de etanol proporcionalmente. Ex.: 400µl de amostra requer 400µl de etanol.
- 7) Aplicar cuidadosamente a mistura da etapa 6 o QIAamp Mini Spin Column (em um tubo de coleta 2ml) sem molhar as beiradas. Fechar a capsula e centrifugar a 6000xg (8000rpm) por 1,5 minutos. Colocar o QIAamp Mini Spin Column em um tubo limpo (2ml) e descartar o tubo contendo o filtrado;
- 8) Abrir cuidadosamente o QIAamp Mini Spin Column e adicionar 500µl do tampão AW1 (se molhar as beiradas). Fechar a capsula e centrifugar em 6000xg (8000rpm) por 1 minuto. Colocar o QIAamp Mini Spin Column em um tubo limpo (2ml) e descartar o tubo contendo o filtrado.

- Não é necessário aumentar o volume do tampão AW1 se o volume da amostra original for maior que 200µl.
- 9) Abrir cuidadosamente o QIAamp Mini Spin Column e adicionar 500µl de tampão AW2 (sem molhar as beiradas). Fechar a capsula e centrifugar na velocidade máxima (20000xg; 14000rpm) por 3 minutos.
- 10) RECOMENDAÇÃO: Colocar o QIAamp em um novo tubo de coleta de 2ml e descartar o tubo de coleta sem o filtrado. Centrifugar em velocidade máxima por 1 minuto.

- 11) Colocar o QIAamp Mini Spin Column em um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e descartar o tubo contendo o filtrado. Abrir cuidadosamente o QIAamp Mini Spin Column e adicionar 150µl de tampão AE ou água destilada. Incubar em temperatura ambiente (15-25°) por 5 minutos e então centrifugar a 6000xg (8000rpm) por 1,5 minutos.

Traduzido do manual de instruções *QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit* (Qiagen[®], Hilden – Alemanha).