



PESQUISA DE DNA PRÓ-VIRAL DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE DESMODUS ROTUNDUS

Autores: Keila Catarina PRIOR; Mylena Karoline VALMORBIDA, Diogenes DEZEN; Marcella Zampolli TRONCARELLI;

Identificação autores: Bolsista PIBIT/CNPq; Coautora IFC-Campus Concórdia; Orientador IFC-Campus Concórdia; Co-orientadora IFC-Campus Concórdia

RESUMO

A Leucose é uma doença viral, a qual causa um quadro de linfocitose persistente em bovinos e pode evoluir para a forma neoplásica. Sabe-se que o morcego-hematófago *Desmodus rotundus* é reservatório para diversos vírus. Entretanto, até o momento seu papel como um possível reservatório deste agente ainda não foi elucidado. Portanto, este trabalho otimizou 4 reações de PCR para detecção de BLV, sendo que em uma delas 16 amostras apresentaram uma banda de tamanho superior a do controle positivo. Entretanto, a especificidade dos amplicons só pode ser determinada a partir de sequenciamento genético, o que pretende-se realizar em estudos futuros.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma enfermidade viral crônica, que foi descrita pela primeira vez em 1871 (RAVAZZOLO; COSTA, 2007). Ela causa em bovinos um quadro de linfocitose persistente, podendo evoluir para a forma neoplásica com a formação de linfossarcomas (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A doença é causada pelo vírus da leucose bovina (BLV), o qual é disseminado no rebanho principalmente através de fômites contaminados com sangue, como: agulhas, luvas de palpação e instrumentais cirúrgicos (BIRGEL JUNIOR et al., 2006).

A fonte de infecção do vírus é o bovino infectado, sendo que outros reservatórios ainda não foram descritos (QUINN et al., 2005). No entanto sabe-se que o morcego *Desmodus rotundus*, é um reservatório de diversos patógenos (CALISHER et al., 2006), e que a principal fonte de alimentação deste quiróptero é o sangue bovino (VOIGT; KELM, 2006).

Em estudos prévios, nossa equipe identificou um morcego sorologicamente positivo para o BLV na técnica de imunodifusão em ágar gel (IDGA). Deste modo, objetivou-se investigar a possível presença de DNA pró-viral do BLV em amostras de tecidos desse quiróptero, a partir de diferentes protocolos de reação em cadeia de polimerase (PCR) e assim estabelecer o possível papel do morcego hematófago como reservatório desse vírus.



METODOLOGIA

As amostras biológicas foram obtidas de 48 morcegos hematófagos (*Desmodus rotundus*) capturados em 4 municípios na região oeste de Santa Catarina. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IFC-Concórdia, pelo protocolo 36/2014 e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) nº 41104. Dos morcegos, foram utilizadas 47 amostras de sangue total e uma amostra de fragmento de baço. Como controle positivo, foram utilizadas duas amostras de sangue de bovinos soropositivos para BLV na técnica de IDGA.

Para extração de DNA, utilizou-se um kit comercial, baseado no sistema de coluna de sílica (G-spin™ Total DNA – iNtRON-Biotechnology), e o protocolo de extração seguiu as instruções do fabricante.

Para as PCRs, foram utilizados quatro oligonucleotídeos, previamente descritos por Limansky et al (2002). Foram testadas 4 combinações de oligonucleotídeos: produzindo amplicons com tamanho deduzido de 516, 241, 392 e 363 pb, respectivamente. Para cada combinação foi determinada a concentração ótima de MgCl₂ (1,0; 1,5 e 2,0 mM) e a temperatura de anelamento (58 a 66°C). A determinação de condições ótimas foi estabelecida utilizando o controle positivo e através da análise visual dos produtos de PCRs, onde se observou a intensidade da banda específica, presença de bandas espúrias e formação de dímeros/*hairpins*.

Os produtos de amplificação foram submetidos ao procedimento de eletroforese, e posteriormente a imagem do gel foi capturada em um aparelho de fotodocumentação (Loccus Biotecnologia) e avaliada no software L-Pix Image.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O DNA extraído não apresentou sinais de degradação, indicando a qualidade do material obtido. A obtenção de um material genético de boa qualidade está diretamente relacionada as condições pré-analíticas como: o tipo de amostra utilizado, os métodos e condições de armazenamento, extração incompleta e a introdução indesejável de inibidores ou contaminantes (VALENTINE-THON, 2002).

A concentração ótima estabelecida de MgCl₂ foi de 1,5mM para todas as reações testadas (Figura 1). O ajuste da concentração de cloreto de magnésio

(MgCl₂), certamente é um dos pontos mais importantes da padronização, visto que trata-se de um dos componentes que mais interfere na técnica. (OLIVEIRA, 2007).

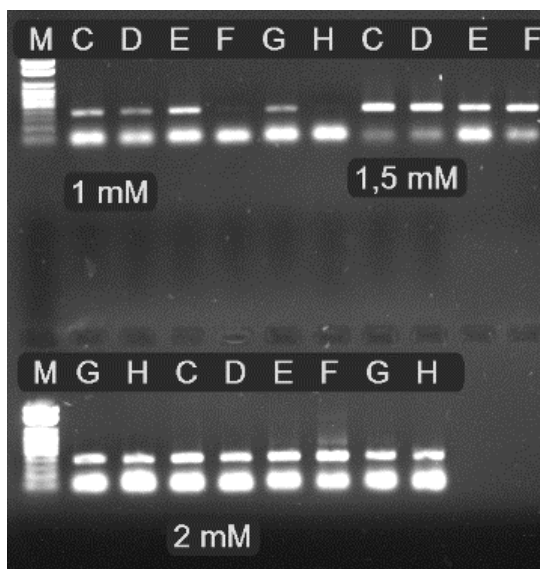


Figura 01. Curva de MgCl₂ e Curva do gradiente de temperatura. T_m variável de 68 (coluna C) 62°C (coluna H) e concentração de MgCl₂ variável de 1, 1,5 e 2 mM.

As temperaturas de anelamento otimizadas foram de 62, 66, 62 e 59,5°C para as reações 1, 2, 3 e 4 (Figura 2), respectivamente. A temperatura de anelamento dos primers pode interferir diretamente nas reações de PCR, uma vez que quando são utilizadas baixas temperaturas de anelamento, pode ocorrer a amplificação de fragmentos inespecíficos do genoma. Por outro lado, com o uso de temperaturas muito elevadas, que em geral aumentam a especificidade, alguns animais positivos podem não ser identificados devido à redução de sensibilidade (RYCHLIK et al., 1990).

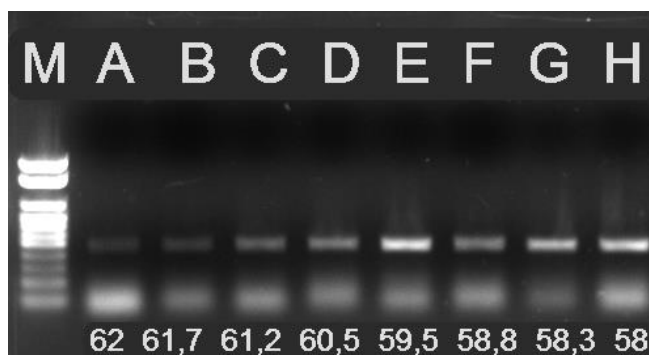


Figura 02. Gradiente de temperatura evidenciando 59,5°C como temperatura ideal de trabalho da reação 4

Nas reações 1, 2 e 3 não se observou presença de amplificação nas amostras testadas. Entretanto, na reação 4 detectou-se uma banda de aproximadamente 450 bp em 16 amostras (Figura 03), incluindo a amostra do morcego sorologicamente positivo (amostra 01). O tamanho da banda detectada nas amostras de *D. rotundus* difere do controle positivo (363 pb).

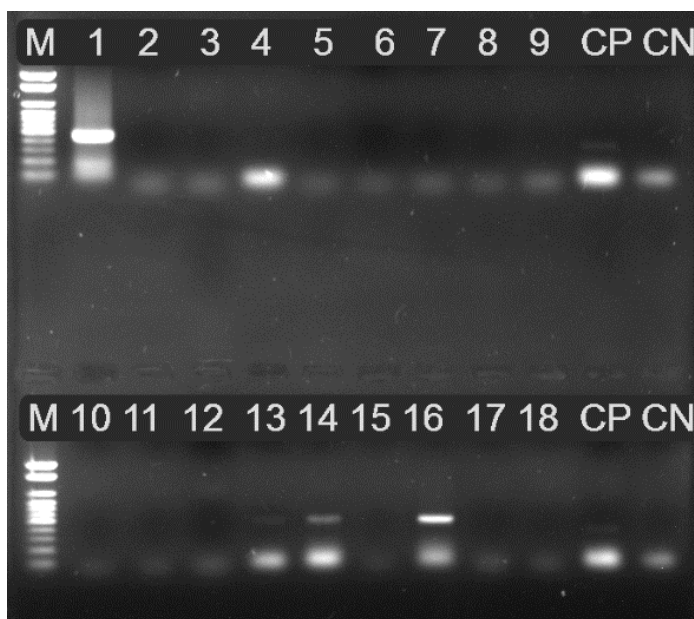


Figura 03. Reação 4. Amplificação nas amostras 1, 13, 14 e 16. CP: controle positivo, CN: controle negativo, M: marcador de peso molecular.

As bandas resultantes da reação 4 podem ser inespecíficas ou produto da amplificação de uma variante do BLV, tais hipóteses podem ser elucidadas por meio do sequenciamento do DNA do amplicon, o que representa a próxima fase deste estudo. Contudo, se as amostras revelarem sequência genética similar ao do BLV é possível que se possa inferir que o *Desmodus rotundus* seria um reservatório do vírus e um provável agente disseminador da enfermidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diferentes combinações de oligonucleotídeos, utilizados no presente estudo, permitiram a amplificação de DNA pró-viral do BLV nos controles positivos, o que permite utilizar o protocolo de reação na rotina diagnóstica. Além disso, foi possível determinar condições ótimas de amplificação visando aumentar a sensibilidade da

técnica. No entanto, não se obteve amplificação nas amostras de *Desmodus rotundus*, exceto na reação 4, das quais 16 amostras apresentaram à amplificação de um fragmento de tamanho superior ao do controle. Estudos futuros são necessários para determinar a sequência genética do fragmento e elucidar sua origem.

REFERÊNCIAS

BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Prevalência da Infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça simental, criados no estado de São Paulo. *ARS veterinária*, Jaboticabal, v.22, n.2, p.122-129, 2006.

CALISHER, C. H. et al. Bats: important reservoir hosts of emerging viroses. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v.19, n.3, p. 530-544, 2006.

LIMANSKY, A. P.; LIMANSKAYA, O.Y. Comparison of primer sets for the detection of bovine leucemia vírus by polymerase chain reaction. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, Pulawy, v.46, p.27-36, 2002.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Retroviridae. In: _____. Fenner's veterinary virology. 4.ed. San Diego: Elsevier, 2011. p.243-274.

OLIVEIRA, R. R. Padronização e comparação de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de metapneumovírus humano em secreções respiratórias. 2007. 90p. Dissertação (mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

QUINN, P. J. et al. Retroviridae. In: _____. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 346-347.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. *Retroviridae*. In: FLORES, E. F. Virologia Veterinária. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2007. p. 809-837.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, Londres, v. 18, n.21, p. 6409-6412, 1990.

VALENTINE-THON, E. Quality control in nucleic acid testing - where do we stand?. *Journal of clinical virology*, Amsterdam, v.25, p.13-21.

VOIGT, C. C.; KELM, D. H. Host preference of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*; Chiroptera) asseded by stable isotopes. *Journal of Mammalogy*, Lawrence, v.87, n.1, p.1-6, 2006.