



**Universidade Federal do Pará
Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental
Universidade Federal Rural da Amazônia
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Tatiane Teles Albernaz Ferreira

Detecção molecular do Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado Pará

**Belém
2014**

Tatiane Teles Albernaz Ferreira

Detecção molecular do Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado Pará

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Orientador: Dr. José Diomedes Barbosa Neto.

Co-Orientadores: Dr. Rômulo Cerqueira Leite e Dr. Felipe Masiero Salvarani.

**Belém
2014**

Tatiane Teles Albernaz Ferreira

Detecção molecular do Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV) em búfalos (*Bubalus bubalis*) no estado Pará

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia. Área de concentração: Sanidade Animal.

Belém - PA: 12 de dezembro de 2014.

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Diomedes Barbosa Neto (Presidente)
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite (Membro Titular)
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis (Membro Titular)
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dr^a. Marilene de Farias Brito (Membro Titular)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Prof. Dr. Felipe Masiero Salvarani (Membro Titular)
Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)

Ao meu esposo Paulo Allan
e a minha filha Thaís.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não seria possível sem a ajuda e o apoio de determinadas pessoas que demonstraram prestatividade e carinho incondicional. Tentando não esquecer ninguém quero agradecer:

Em primeiro lugar a Deus por ser meu porto seguro, sempre atender meus pedidos e jamais me desamparar.

A meu esposo Allan, o qual sempre me apoiou e incentivou a concluir mais essa etapa da minha vida. Obrigada por suportar meus estresses e minha ausência e da nossa filha durante o período experimental.

A minha filha Thaís, minha princesa, por todo estresse que a fiz passar com essa tese desde a gravidez. Seu sorriso ao chegar em casa sempre renovou meu ânimo e me deu forças pra continuar.

A meus pais Zilmar e Albernaz que apesar de não entenderem muito o significado dessa tese na minha vida profissional sempre me apoiaram. Obrigada por terem me mostrado o melhor caminho a seguir.

Aos meus irmãos Aline, Wecstyley e Aparecida por todo o amor e amizade, por conseguirem me proporcionar alegrias mesmo em momentos tão difíceis.

A minha segunda família, Graciete, Ferlucio, Felipe, Franklim, Mayanne e Laura que apesar da distância sempre me acolheram em seus corações e me incentivaram.

Ao meu orientador e amigo Dr. José Diomedes Barbosa Neto, pessoa que Deus colocou no meu caminho para me ensinar a amar a Medicina Veterinária e instigar-me a ambição pelo conhecimento. Obrigada por ter acreditado e não ter desistido de mim, desde a iniciação científica. Quando eu achava que nada mais dava certo, o senhor com toda a sua perseverança sempre surgia com um plano “b”. Obrigada por tudo.

Ao meu amigo prof^o Dr. Carlos Magno Chaves Oliveira pessoa que aprendi amar como irmão, sempre pronto pra me ajudar quando preciso. Obrigada pelo carinho ímpar, amizade e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos, colegas de trabalho e compadres Alcides e Natália obrigada por toda a amizade, pelas descontrações nos momentos difíceis e por acreditarem que tudo iria dar certo.

Aos amigos Marcos Dutra e Valéria Cerqueira por estarem sempre dispostos a me ajudar quando preciso.

Ao meu co-orientador prof^o Dr. Rômulo Cerqueira Leite pela sugestão do tema dessa tese, por toda confiança depositada em mim e por ter me dado a oportunidade de ir para a UFMG desenvolver a parte experimental dessa tese. Obrigada por me amparar e sempre estar disposto a me ajudar.

Ao prof^o Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, por ter aberto as portas do Laboratório de Retrovírus da UFMG – RetroLab para que eu pudesse realizar minhas análises. Obrigada pela confiança, prestatividade e carinho.

Ao meu segundo co-orientador prof^o Dr. Felipe Masiero Salvarani pelas sugestões nessa tese e sempre estar disposto a me ajudar.

A prof^a Dra. Marilene de Farias Brito por ter aceitado participar da banca e estar sempre disposta em contribuir com seus conhecimentos.

A MSc. Ana Paula de Souza Rodrigues, um anjo que Deus colocou na minha vida, com a qual construí uma amizade sincera. Obrigada por ter destinado seu tempo a me ensinar a biologia molecular e sempre estar disponível para tirar minhas dúvidas. Quando nada estava dando certo, você sempre me consolava dizendo que Deus não tinha me colocado ali por acaso. Obrigada por acreditar que eu seria capaz de concluir esse trabalho.

Ao amigo Cairo Oliveira por ter abrigado minha filha, a babá e eu em seu apartamento. Obrigada por todo companheirismo, amizade e paciência.

A toda equipe da clínica de grandes animais, Alessandra Belo, Danilo Henrique, Henrique Bomjardim, Nayra Queiroz, Melina Garcia, Wagner Marcelo, André Gibson, Tarciso Santos, Raimundo Siqueira, Hugo Perdigão, Rafaela das Mercês e Luis Henrique, que sabe o quanto caminhei pra chegar até aqui. Obrigada por me ajudarem sempre nos vários planos de tese de doutorado, desde o trabalho com vacinação de brucelose em bezerros, passando pela fuga dos búfalos do trabalho da brucelose, pelo trabalho da intoxicação por potássio em equinos, coleta de material no matadouro para o trabalho da tuberculose, até a conclusão desta.

A toda a família RetroLab, em especial a Cláudia, Telissa, Paula, Stefanne, Lízia, Luciana e Camila, pelo carinho, contribuições e momentos de plena alegria, vocês estarão para sempre em meu coração.

A técnica da UFMG Grazielli pela amizade, prestatividade e por auxiliar nas minhas análises.

A todos que não foram citados, mas que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A sabedoria é o sustentáculo da vida do ser humano, mas para se tê-la é preciso honrar os livros, respeitar e acatar os sábios.

Leopoldo Napoleão

RESUMO

A imunodeficiência viral bovina é uma doença crônica e progressiva causada por um lentivírus que acomete bovinos e bubalinos. Embora a infecção seja relatada em bovinos em vários países do mundo, inclusive no Brasil, em bubalinos só existem dois relatos da infecção, um no Paquistão e outro no Camboja. Diante disso o objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em búfalos provenientes do estado do Pará, região Norte do Brasil. Para verificar a ocorrência do BIV no rebanho foi feita a detecção do DNA proviral em 607 amostras de sangue de búfalos obtidas de 10 propriedades do estado do Pará, por meio da reação em cadeia da polimerase - *semi-nested* (PCR-SN) utilizando-se *primers* específicos para a região *pol* do genoma do vírus. Das 607 amostras testadas na PCR-SN para o BIV, 27 (4,4%) foram positivas. 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%. Epidemiologicamente, este estudo fornece dados iniciais importantes, que revelam a primeira detecção no Brasil da presença do BIV em bubalinos e alertando sobre a possibilidade do vírus funcionar como um fator de risco para a saúde das populações de bubalinos e um potencial agente causador de doença crônica.

Palavras chave: Vírus da imunodeficiência bovina. PCR-SN. Ocorrência. Búfalo. Pará.

ABSTRACT

Bovine viral immunodeficiency is a chronic and progressive disease caused by a lentivirus that affects cattle and buffalo. Although infection is reported in cattle in several countries, including Brazil, in buffalo there are only two reports of infection, one in Pakistan and one in Cambodia. The aim of this research was to verify the occurrence of bovine immunodeficiency virus (BIV) in buffaloes from the state of Pará, northern Brazil. To verify the occurrence of BIV in herds, the detection of proviral DNA in blood samples from 607 buffaloes obtained from 10 properties in the State of Pará, by semi-nested polymerase chain reaction (snPCR) were made using primers specific for the pol region in the genome of the virus. The 607 samples tested by snPCR for the BIV, 27 (4.4%) were positive. The amplified sequences were confirmed by cloning and nucleotide sequencing. The similarity of nucleotide sequence of the isolates with the reference strain (R-29) was 99%. Epidemiologically, this study provides important initial data, reporting the first detection of BIV in buffaloes in the Brazil and warning of the possibility of the virus function as a risk factor for the health of populations of buffaloes and a potential causative agent of chronic disease.

Keywords: Bovine immunodeficiency virus. Semi-nested PCR. Occurrence. Buffalo. Pará.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

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 as enzimas integrase (IN), protease (PR) e transcriptase reversa (RT) e o RNA genômico, que é protegido pelo capsídeo, formando o nucleocapsídeo (NC).....19

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.....20

Capítulo II

Figura 1: Amplificação do gene GAPDH do DNA das amostras extraídas da camada leucocitária de búfalos em eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Padrão de tamanho molecular de 100pb. 1: Controle negativo. 2-10: Produto de PCR para amplificação do gene GAPDH.....34

Figura 2: Amplificação do gene pol do DNA das amostras extraídas da camada leucocitária de búfalos através da PCR-SN em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M - Padrão de tamanho molecular de 100 pb. 1 - Controle positivo. 2 - Controle negativo. 3, 10, 11 e 12 - Amostras positivas. 4 a 9 - Amostras negativas.....35

Figura 3: Amplificação de fragmentos *pol* clonados em plasmídeos pGEM a partir das amostras extraídas da camada leucocitária de búfalos através da PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. 1: Controle positivo. 2: Controle negativo. 3: Clone PA280. 4: Clone PA519. 5: Clone PA3257.....39

Figura 4. Confirmação da identidade do clone PA280 com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus da imunodeficiência bovina, a cepa R-29, depositada no *GenBank*, mostrando alta similaridade (99%), através do software público BLAST.....40

Figura 5. Confirmação da identidade do clone PA519 com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus da imunodeficiência bovina, a cepa R-29, depositada no *GenBank*, mostrando alta similaridade (99%), através do software público BLAST.....40

Figura 6. Confirmação da identidade do clone PA3257 com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus da imunodeficiência bovina, a cepa R-29, depositada no *GenBank*, mostrando alta similaridade (99%), através do software público BLAST.....41

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1- Manifestações clínicas e patológicas dos *Lentivírus*.....18

Tabela 2- Ocorrência e distribuição mundial do BIV.....23

Capítulo II

Tabela 1- *Primers* para o GAPDH.....31

Tabela 2- Porcentagem de animais positivos para o BIV por propriedade do estado do Pará, testados através PCR-SN.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS** - síndrome da imunodeficiência adquirida
- AIEV** – vírus da anemia infecciosa eqüina
- BIV** – vírus da imunodeficiência bovina
- BLV** – vírus da leucose enzoótica bovina
- BHV** – herpes vírus bovino
- BSV** - vírus sincicial bovino
- CA** – capsídeo viral
- CAEV** – vírus da artrite encefalite caprina
- CCR5** – receptor de quimiocinas com o domínio CC do tipo - 5
- DMVP** – departamento de medicina veterinária e preventiva
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- dNTP** – desoxirribonucleotídeo fosfatado
- ELISA** – ensaio imunoenzimático
- Env** – envelope
- EV - UFMG** – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais
- 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
- IFA** – imunofluorescência indireta
- IN** – integrase
- IPTG** – isopropil-tio-galactosídeo
- JVD** – vírus da doença de Jembrana
- LTR** – regiões longas terminais
- µL** – microlitro
- mM** - milímetros
- MVV** – vírus maed-visna
- NC** – nucleocapsídeo
- ng** – nanograma
- PBMC** – células mononucleares periféricas do sangue

pmol – picomol

PCR – reação em cadeia da polimerase

PCR-SN – reação em cadeia da polimerase *semi nested*

Pol – polimerase

PR – protease

RetroLab – Laboratório de Retrovírus

Rev – regulador de expressão viral

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

RT – transcriptase reversa

RT-PCR – transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

SIV – vírus da imunodeficiência símia

SU – superfície viral

Taq – *Thermus aquaticus*

Tat – transativador de transcrição

TM - proteína transmembrana

UFPA – Universidade Federal do Pará

Vif – fator de infectividade viral

X-Gal – análogo da galactose

WB – Western Blot

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 HISTÓRICO	16
2.2 ETIOLOGIA E PATOGENIA	17
2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO BIV	20
2.4 EPIDEMIOLOGIA	21
2.5 ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS	24
2.6 DIAGNÓSTICO	25
2.7 PROFILAXIA E CONTROLE	25
CAPÍTULO II	26
DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA BOVINA (BIV) EM BÚFALOS (<i>Bubalus bubalis</i>) DO ESTADO PARÁ	26
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1 INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	29
2.2 AMOSTRAS DE SANGUE.....	29
2.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO PROVIRAL	29
2.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	30
2.5 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCRs)	30
2.5.1 PCR para o gene normalizador GAPDH	30
2.5.2 PCR e PCR <i>Semi Nested</i> (PCR-SN) para o BIV	31
2.6 CONTROLE POSITIVO	32
2.7 CLONAGEM	32
2.7.1 Clonagem das sequências <i>biv-pol</i> amplificadas das amostras de campo	32
2.7.2 Sequenciamento nucleotídico das amostras (<i>pol - BIV</i>) de campo clonadas em plasmídeo Pgem	33
2.7.3 Análise Molecular	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4 CONCLUSÃO	42
5 PERSPECTIVAS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A criação de búfalos vem crescendo progressivamente em todo o mundo. A espécie bubalina desempenha um relevante papel na produção de alimento, principalmente nos países em desenvolvimento, localizados em sua maioria nas áreas tropicais. Assumem também um relevante papel social e econômico na Índia, Paquistão, Filipinas, Vietnam, Malásia e Tailândia. Atualmente a bubalinocultura está em significativa expansão em muitos países do mundo, como é o caso do Brasil.

Nos últimos 30 anos, o rebanho bubalino brasileiro apresentou crescimento de 129,48%. Dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de 2013 apontam um rebanho nacional de aproximadamente 1,1 milhões de cabeças, distribuídas pelas cinco regiões do país, sendo que a região Norte é a que possui o maior contingente, com 64% do total. Nessa região, o estado do Pará detém o maior rebanho de bubalinos com 461.275 cabeças, que representa 39% do efetivo nacional.

Ao longo dos anos a bubalinocultura tem se expandido no Brasil, onde deixou de ser utilizada somente para ocupação de terras impróprias para criação de gado bovino e passou a ser uma opção de criação pecuária. O preço pago pelo litro do leite e a exportação de animais de reprodução para a Venezuela, Colômbia e Filipinas tem aumentado a visibilidade da bubalinocultura nos últimos cinco anos, além do investimento em estratégias de *marketing* que provocou maior divulgação e aumento do consumo de produtos lácteos produzidos a partir do leite de búfala. A atividade está passando por um pico de expansão, e tem potencial para tal, pois se trata de animais rústicos, adaptados ao sistema de criação brasileiro, dóceis e fáceis para trabalhar na rotina quando são manejados de maneira adequada. Esta capacidade coloca os búfalos como um dos maiores aliados do homem e contribui no desenvolvimento da produção de leite, carne, couro e trabalho.

O leite produzido pelas búfalas apresenta os componentes físico-químicos como gordura, proteína e sólidos totais superiores aos encontrados no leite bovino. Os componentes da carne de búfalos são idênticos aos encontrados na carne bovina, entretanto a carne do búfalo se apresenta ligeiramente mais vermelha, com mais firmeza, gordura mais clara e com baixos teores de colesterol.

Atualmente o governo brasileiro está investindo na bubalinocultura em propriedades que praticam agricultura familiar, por meio do PRONAF (Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar), incentivando a utilização dos bubalinos na tração animal, no aproveitamento de adubo orgânico e a produção de leite para o sustento familiar.

Com isso, a preocupação com a sanidade do rebanho bubalino tem aumentado consideravelmente, pois muitos aspectos das doenças em búfalos não são conhecidos e em razão da grande rusticidade, propaga-se o conceito de que os búfalos são resistentes a várias doenças que acometem bovinos. Entretanto, sabe-se que estes animais são susceptíveis à maior parte dos agentes infecciosos que acometem os bovinos, como, por exemplo, o agente da imunodeficiência viral bovina que causa uma doença crônica e progressiva causada por um retrovírus que possui ampla distribuição mundial.

Embora os estudos já tenham progredido bastante em bovinos, em bubalinos, até o presente momento, não há relato na literatura do isolamento do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) e existem apenas dois estudos sorológicos e moleculares, um no Paquistão e outro no Camboja.

Devido à ampla distribuição mundial do BIV, a escassez de dados na literatura e a ausência de estudos em bubalinos no Brasil, objetivou-se verificar a ocorrência da infecção, por meio da detecção molecular, do BIV em búfalos do estado do Pará.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

O vírus da imunodeficiência bovina (BIV) foi descoberto em 1969, quando os pesquisadores Cameron Seger e Martin Van der Maater em uma pesquisa intensiva sobre o agente causador da leucose enzoótica bovina, realizaram um estudo de campo com um rebanho leiteiro da Estação Experimental do Sudeste da Louisiana em Franklinton, Estados Unidos. Após vários exames, foi observado que estes animais apresentavam leucocitose, que foi atribuído ao aumento de linfócitos, condição compatível a um quadro clínico de leucemia bovina. Mas o que lhes chamou a atenção foram as alterações clínicas de linfadenopatia, fraqueza progressiva e emagrecimento, apresentadas por uma vaca leiteira da raça Holstein, prenhe, de oito anos de idade (vaca R-29), sugerindo um quadro típico de leucose (GONDA *et al.*, 1994; ST-LOUIS *et al.*, 2004). Após o nascimento do bezerro, as condições dessa vaca pioraram e todas as tentativas para reverter o quadro falharam. O animal morreu e foram realizadas necropsia e histopatologia, onde se observou infiltrados perivasculares em alguns vasos no cérebro e aumento dos gânglios linfáticos (SUAREZ *et al.*, 1993; GONDA *et al.*, 1994).

Em 1972, Van der Maaten *et al.* estudaram bezerros privados de colostro bovino, inoculados com células infectadas com leucócitos e tecidos da R-29. Estes animais não apresentaram sinais clínicos evidentes, porém, desenvolveram linfadenopatia facilmente detectável 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 R-29 (ONUMA *et al.*, 1992; GONDA *et al.*, 1994; 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 *Lentivirus* ovino, foi primeiramente designado como "bovine visna-like virus" (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 vírus da imunodeficiência humana (HIV), na década de 1980, devido à emergência da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), face à necessidade urgente em se 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 deste vírus para a medicina veterinária e humana (MEAS *et al.*, 1998), e sugeriram que este poderia ser uma alternativa como modelo biológico 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 *et al.* (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).

Novas informações sobre a biologia molecular do BIV foram derivadas do trabalho de Braun *et al.* (1988) e Garvey *et al.* (1990), que geraram e caracterizaram dois clones de cDNA infecciosos, chamados BIV 106 e BIV 127, a partir do isolado BIV R-29. Posteriormente, Suarez *et al.* (1993) isolaram duas estirpes de campo do BIV adicionais, denominado FL491 e FL112, associado com o desenvolvimento de leucocitose. No entanto, a maioria das informações sobre patogenicidade, sorologia e análises moleculares foi obtida apenas dos estudos do isolado R-29.

2.2 ETIOLOGIA E PATOGENIA

O vírus da imunodeficiência viral bovina pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus* (FLORES, 2007). Essa família se caracteriza por causar infecção persistente em várias espécies animais. Os retrovírus possuem vírions envelopados e apresentam duas fitas simples de RNA idênticas não complementares. Os membros dessa família são assim denominados por possuírem uma enzima capaz de sintetizar uma molécula de DNA a partir da transcrição do seu genoma de RNA, mecanismo chamado de transcrição reversa. A enzima que cataliza esta reação, a transcriptase reversa (RT), é um componente dos vírions e possui, ainda, outras atividades essenciais para a replicação viral. A etapa de

transcrição reversa se constitui no evento central da multiplicação dos retrovírus (FLORES, 2007).

Os lentivírus partilham propriedades estruturais, genéticas, biológicas e/ou patogênicas comuns. Os vírus pertencentes a esse gênero são: vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da imunodeficiência símia (SIV) em primatas, vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus Maedi-Visna (MVV) em ovinos, vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), vírus da anemia infecciosa equina (AIEV), vírus da doença Jembrana (JDV) em bovinos e o vírus da imunodeficiência bovina (BIV) (Tab. 1).

Tabela 1. Manifestações clínicas e patológicas dos lentivírus

Lentivírus	Hospedeiro	Desordens clínicas/patológicas
Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV)	Bovídeos	Linfocitose, linfadenopatia, infecções oportunistas, lesões no sistema nervoso central, fraqueza e emagrecimento
Vírus da Doença de Jembrana (JDV)	Bovinos balineses	Febre, letargia, anorexia e linfadenopatia
Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	Humanos	Imunodeficiência, linfadenopatia, infecções oportunistas, encefalopatia, sarcoma de Kaposi
Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)	Felinos	Imunodeficiência, linfadenopatia, infecções oportunistas, leucopenia, anemia
Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV)	Primatas	Imunodeficiência, neuropatologia, infecções oportunistas em macacos <i>Rhesus</i>
Vírus Maedi-Visna (MVV)	Ovinos	Encefalite, pneumonia, linfadenopatia, paralisia, infecções oportunistas,
Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)	Caprinos	Artrite, encefalite, paralisia, Pneumonia
Vírus da Anemia Infecciosa Equina (AIE)	Equídeos	Anemia hemolítica, linfoproliferação, glomerulonefrite, encefalopatia

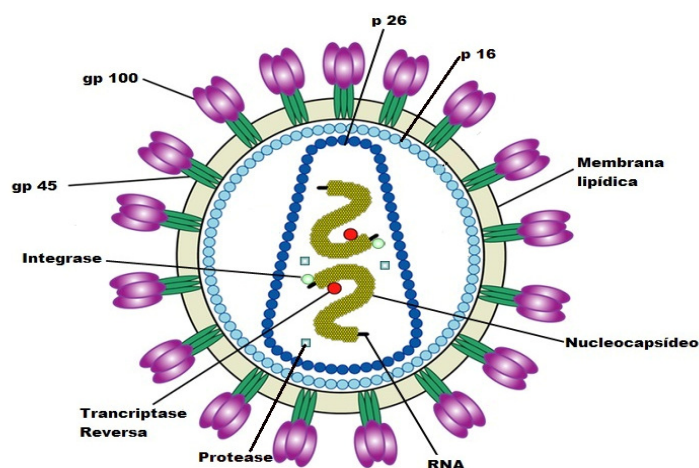
Adaptada de St-Louis *et al.*, 2004.

Os lentivírus não são oncogênicos e partilham também um período de incubação relativamente longo, seguido por uma fase sintomática, embora o hospedeiro apresente uma resposta imune facilmente detectável, com exceção do vírus da Anemia Infecciosa Equina, o qual apresenta inicialmente uma fase sintomática, seguida por uma longa fase assintomática. Alterações patológicas e degenerativas crônicas, muitas vezes associada ao desenvolvimento de lesões imunomediadas no hospedeiro infectado, também são características da infecção pelos lentivírus (DESROSIERS, 2007).

A maioria dos lentivírus 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; TAJBAKHSI *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 envolvidas na regulação da expressão viral (ST-LOUIS *et al.*, 2004).

A morfologia do BIV é semelhante a do HIV, com aproximadamente 120-130 nm de diâmetro (Figura. 1). O envelope viral apresenta uma bicamada lipídica e é composto pela proteína da superfície viral gp100 e a proteína transmembrana gp45 que envolvem o capsídeo viral cônico, típico dos lentivírus, e as proteínas do nucleocapsídeo que protegem o genoma (ST-LOUIS *et al.*, 2004; CORREDOR *et al.*, 2010; MOMTAZ *et al.*, 2010).

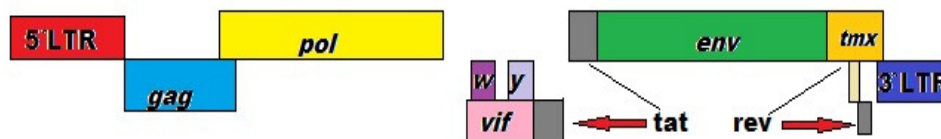
Figura 1. Morfologia esquemática do vírus da imunodeficiência bovina (BIV). O envelope viral é composto pela proteína de superfície gp 100, glicoproteína transmembrana gp45 e a proteína p16 que forma a matriz viral. A estrutura em forma de cone é composta da proteína do capsídeo viral p26 envolvendo a enzima integrase, a protease e transcriptase reversa e o RNA genômico, que é protegido pelo capsídeo, formando o nucleocapsídeo.



Fonte: Adaptado de Niaid (2005).

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 regiões terminais repetidas (LTRs) (5' e 3') 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. 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*, e *tmx*.



Fonte: adaptado de Corredor *et al.* (2010)

2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO DO BIV

O ciclo de replicação do BIV é semelhante ao de outros retrovírus. A infecção viral é iniciada quando a proteína BIV SU se liga aos receptores das células alvo. Esta interação promove uma alteração conformacional que apresenta o domínio hidrofóbico da proteína TM viral, resultando na fusão do envelope viral com a membrana da célula infectada. Esta fusão facilita a entrada do vírus na célula e é seguida pela liberação do capsídeo viral para o citoplasma (SOMMERFELT, 1999). Embora o receptor celular para o BIV ainda não esteja determinado, sugere-se que o BIV pode-se ligar ao CCR5, uma molécula da família dos receptores de quimiocina β (WRIGHT *et al.*, 2002). O CCR5 atua como um co-receptor para a infectividade de certas estirpes de HIV que mostra um tropismo para as células da linhagem monócito/fagocitário (ALKHATIB *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1997).

O evento de desencapsulamento libera o RNA genômico para o citoplasma da célula infectada, onde é transcrito de forma inversa pela transcriptase reversa viral codificada pelo gene *pol* no DNA de cadeia dupla (também conhecido como DNA proviral). Depois disso, o DNA proviral integra-se no genoma da célula hospedeira através da ação da integrase viral. O DNA proviral pode permanecer silencioso, ou mediante estímulos apropriados, servir como

um molde de DNA para a síntese de novas proteínas virais e RNAs genômicos (ALKHATIB *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1997).

A expressão do gene do BIV é caracterizado por cinco mRNAs virais que tem 8,5, 4,1, 3,8, 1,7 e 1,4 kb de comprimento. Em eventos iniciais, genes regulatórios, não estruturais, *tat* e *rev* são transcritos a partir dos pequenos transcritos virais emendados de 1,7 e 1,4 kb, respectivamente. Depois disso, a proteína *tat* migra para o núcleo para aumentar a expressão de todos os genes do BIV, enquanto que a proteína *rev* é envolvida no transporte do núcleo para o citoplasma de RNAs virais isoladamente ou não (OBERSTE *et al.*, 1991).

A proteína do capsídeo (derivado do precursor de *gag*) e o precursor de enzima *gag-pol* são traduzidos a partir do transcrito de comprimento completo de 8,5 kb. A tradução da transcrição dos emendados isolados de 3,8 kb resultam na produção da proteína do envelope (*env*), enquanto que os transcritos emendados isolados de 4,1 kb produziria uma proteína putativa, designada fator de infectividade viral (*vif*). A proteína *env*, assim como os precursores de *gag* e *gag-pol*, migra para a membrana plasmática da célula, onde o RNA genômico é envelopado durante o brotamento dos vírions morfologicamente imaturos através da membrana plasmática das células infectadas (OBERSTE *et al.*, 1991).

A morfologia em forma de cone, típico de lentivírus maduros, surge depois da clivagem do precursor de *gag* e *gag-pol* pela protease viral. Em seguida, as novas partículas virais produzidas podem iniciar um novo ciclo de infecção e infectar as células vizinhas (ALKHATIB *et al.*, 1996; WU *et al.*, 1997).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Sob condições naturais, os lentivírus são altamente espécie-específicos. O BIV infecta naturalmente bovinos e existem descrições de infecções em bubalinos, mas pode infectar experimentalmente ovinos, caprinos e coelhos (BURNS, 1994).

Embora a infecção pelo BIV ocorra geralmente na ausência de sinais clínicos da doença, vários fatores podem influenciar o desenvolvimento de infecção clínica aparente. Eles incluem estímulos de estresse, como a exposição a temperaturas extremas, parto e lactação (SNIDER *et al.*, 1997). Predisposições genéticas do hospedeiro natural para responder a infecções por patógenos ou outros vírus também pode influenciar no curso da infecção pelo BIV. Vale salientar que o vírus da leucemia bovina (BLV), o vírus sincicial bovino (BSV) e herpes vírus bovino (BHV) podem ativar a expressão do gene BIV *in vitro* (GENG *et al.*,

1992; PALLANSCH *et al.*, 1992). Ainda não foi determinado se estes vírus ativam a expressão do gene BIV *in vivo*. No entanto, foi demonstrada *in vitro* a redução de resposta linfoproliferativa a antígenos específicos ou a mitógenos (fito-hemaglutinina e concanavalina A) com células mononucleares isoladas a partir de bovinos ou ovinos experimentalmente expostos ao BIV, ou para ambos BIV e BLV (MARTIN *et al.*, 1991; GENG *et al.*, 1992; HIRAI *et al.*, 1996).

O BIV é transmitido verticalmente por via transplacentária e pelo colostro ou horizontalmente por meio da troca de fluídos corporais e pelo sangue. O DNA proviral do BIV já foi detectado *in vivo* em uma grande variedade de tecidos de bovinos, incluindo o cérebro, os pulmões, nódulos linfáticos, baço, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e sêmen (DESROSIERS, 2007). 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 BIV. A transmissão experimental do BIV pode ocorrer através da administração de sangue total de um animal infectado por via intravenosa (BORROW, 1997).

Vários estudos sorológicos sobre a infecção pelo BIV em bovinos têm sido realizados por todo o mundo e demonstraram uma distribuição não uniforme da infecção, com registros que variaram de 1,4% a 80% de prevalência (MEAS *et al.*, 2002; ANDREWS, 2008). Existem somente dois relatos de infecção pelo BIV em búfalos, um no Paquistão com ocorrência de 10,3% (MEAS *et al.*, 2000a) e outro em Camboja com ocorrência de 16,7% (MEAS *et al.*, 2000b).

Apesar de vários estudos sobre a ocorrência da infecção pelo BIV já terem sido realizados pelo mundo (Tab. 2), a presença da infecção em rebanhos brasileiros foi relatada somente por Meas *et al.* (2002) em bovinos de corte e leite, das regiões de Pelotas (RS) e de Campo Grande (MS), com ocorrência de 11,7% e por Rodrigues (2014), em bovinos leiteiros, das regiões da Zona da Mata e Central do estado de Minas Gerais, com uma ocorrência de 12,5%. Esses estudos mostram que a presença do vírus em rebanhos brasileiros não é tão alta quando comparada a outros países, como Irã e Estados Unidos e até a Venezuela, que apresentam ocorrências de 50 até 66%.

Tabela 2: Ocorrência e distribuição mundial do BIV

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

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

2.5 ACHADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

A imunodeficiência viral bovina induz poucos sinais clínicos, porém o vírus foi originalmente isolado de bovinos com linfocitose, linfadenopatia, neuropatia e emagrecimento progressivo (VAN DER MAATEN *et al.*, 1972; GONDA *et al.*, 1992). Atualmente não tem sido associada ao desenvolvimento de nenhuma doença ou síndrome clinicamente identificável (BHATIA *et al.*, 2013), mas 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 clínico-patológicas específicas, e em muitos casos, a infecção pode estar associada a outra enfermidade viral, como a leucose enzoótica bovina, aumentando assim a probabilidade do aparecimento de sinais clínicos (ANDREWS, 2008).

Em bovinos experimentalmente infectados pode ser identificado linfocitose, hiperplasia linfoide e infecções bacterianas secundárias. Alguns sinais 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 (BRUJENI *et al.*, 2010). Em outros casos, é possível constatar sonolência, letargia, ataxia, e, às vezes, tendência ao 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).

Embora o BIV induza disfunção de monócitos e neutrófilos, bezerros inoculados com o vírus não apresentam sinais clínicos graves, e a patogênese da imunodeficiência viral bovina em bovinos ainda continua obscura (CARPENTER *et al.*, 2000; GONZALE *et al.*, 2000; YILMAZ *et al.*, 2008).

Alguns estudos 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 (CARTER, 2008). Porém, a susceptibilidade à infecção pelo BIV pode depender da estirpe do vírus, das raças bovinas e de fatores ambientais (PAYNE, 1987; MOANNA, 2005)

As infecções pelo BIV já foram mostradas ao nível mundial e foram associadas a alterações na produção animal, perda de peso, doença secundária, produção de leite diminuída e aumento da incidência de encefalite (FLAMING *et al.*, 1993; TAJIMA *et al.*, 1997; GRADIL *et al.*, 1999).

Na necropsia e histopatologia algumas alterações tem sido percebidas e inclui aumento dos linfonodos, emaciação e infiltrados linfocitários perivasculares cerebrais leves (MOODY, *et al.*, 2002; TERZIEVA, 2008).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da infecção pelo BIV pode ser realizado pela detecção de anticorpos, com o uso de técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFA), Western Blott (WB) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Anticorpos para o BIV podem ser detectados três semanas após a infecção, e podem persistir por mais de dois anos em animais experimentalmente inoculados (ZHANG, 1997b). A detecção do provírus e do RNA genômico, em células infectadas, pode ser realizada pelo uso de técnicas de PCR e transcriptase reversa PCR (RT-PCR) respectivamente. O isolamento viral é uma técnica pouco utilizada devido à baixa sensibilidade e especificidade (LEITE *et al.*, 2013).

2.7 PROFILAXIA E CONTROLE

As principais medidas de controle da infecção pelo BIV para bovinos consistem na identificação precoce da doença no rebanho e segregação dos animais positivos, uma vez que não existem vacinas comerciais. Outras medidas que podem ser adotadas são: evitar o compartilhamento de agulhas, luvas de palpação retal e materiais cirúrgicos entre os animais; não administrar aos bezerros colostro de fêmeas infectadas; realizar a esterilização de instrumentos utilizados em práticas invasivas, como castrações e descornas (LEITE *et al.*, 2013).

CAPÍTULO II

DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA BOVINA (BIV) EM BÚFALOS (*Bubalus bubalis*) DO ESTADO PARÁ

RESUMO

A imunodeficiência viral bovina é uma doença crônica e progressiva causada por um *Lentivírus* que acomete bovinos e bubalinos. Embora a infecção seja relatada em bovinos em vários países do mundo, inclusive no Brasil, em bubalinos só há dois relatos da infecção, um no Paquistão e outro no Camboja. Por isso o objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em búfalos provenientes do estado do Pará, região Norte do Brasil. Para tal foi realizada a pesquisa do DNA proviral do BIV em 607 amostras de sangue de búfalos, através da reação em cadeia da polimerase - *semi-nested* (PCR-SN) utilizando *primers* específicos para a região *pol* do genoma do vírus. Amostras de sangue foram obtidas de 10 propriedades do estado do Pará, Norte do Brasil. Os resultados da PCR-SN demonstraram que a ocorrência do vírus no Estado foi de 4,4%. 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%. Epidemiologicamente, este estudo fornece dados iniciais importantes, que revelam a primeira detecção no Brasil da presença do BIV em bubalinos, e alertando sobre a possibilidade do vírus funcionar como um fator de risco para a saúde das populações de bubalinos e um potencial agente causador de doença crônica. Porém é necessário que um amplo estudo de prevalência, epidemiologia e patogênese seja realizado para verificar o real papel do BIV em búfalos.

Palavras chave: Vírus da imunodeficiência bovina. PCR *semi-nested*. Ocorrência. Búfalos. Pará.

CHAPTER II

MOLECULAR DETECTION OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS (BIV) IN BUFFALOES IN STATE OF PARÁ

ABSTRACT

The bovine viral immunodeficiency is a chronic and progressive disease caused by a Lentivirus and affects cattle and buffalo. Although the infection is reported in cattle in several countries, including Brazil, in buffaloes there are only two reports of infection, one in Pakistan and one in Cambodia. The aim of this research was verify the occurrence of bovine immunodeficiency virus (BIV) in buffaloes in state of Pará, northern Brazil. For this, the detection of proviral DNA was made in 607 blood samples from Buffaloes by polymerase chain reaction - semi-nested (PCR-SN) using primers specific for the pol region of the genome virus. Blood samples were obtained from 10 properties the State of Pará in northern Brazil. The results of PCR-SN demonstrated that the occurrence of the virus in the State was 4.4%. The amplified sequences were confirmed by cloning and nucleotide sequencing. The similarity of nucleotide sequence of the isolates with the reference strain (R-29) was 99%. Epidemiologically, this study provides important initial data, reporting the first detection of BIV in buffaloes in the Brazil and warning of the possibility of the virus function as a risk factor for the health of populations of buffaloes and a potential causative agent of chronic disease. However it will be necessary that a broad study of prevalence, epidemiology and pathogenesis to verify the actual role of the BIV in buffaloes.

Keywords: Bovine immunodeficiency virus. Semi-nested PCR. Occurrence. Buffalo. Pará.

1 INTRODUÇÃO

Em razão da grande rusticidade, propaga-se o conceito de que os bubalinos são resistentes a várias doenças que acometem bovinos. Entretanto, sabe-se que estes animais são susceptíveis à maior parte dos agentes infecciosos que acometem os bovinos (ADLAKHA *et al.*, 1992) e apesar disto ainda são poucos os estudos dessas doenças em búfalos.

A imunodeficiência viral bovina é causada por um retrovírus que se assemelha genética, bioquímica, antigênica e estruturalmente ao vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1). Por isso 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 e controle da infecção viral (YIN *et al.*, 2008).

O BIV causa uma doença crônica e progressiva e induz sinais de leucocitose persistente, linfadenopatia, emagrecimento e lesões do sistema nervoso central. O vírus também está associado com perda de peso e produção de leite diminuída. Além disso, há evidência de que ele pode causar imunossupressão, podendo desencadear infecções bacterianas secundárias, diminuição da capacidade de resposta imunológica a vacinas e encefalite. Embora tenha sido caracterizado molecularmente, pouco se sabe sobre a biologia da infecção natural do BIV, sendo necessários mais estudos para esclarecer a patogênese do vírus (CORREDOR *et al.*, 2010).

Após o isolamento do BIV em 1972, vários estudos sorológicos e moleculares vem sendo realizados em bovinos ao redor do mundo, porém o papel da infecção pelo BIV na progressão da doença em bovinos ainda permanece sem esclarecimento (CARPENTER *et al.*, 2000; GONZALE *et al.*, 2000; YILMAZ *et al.*, 2008).

A infecção pelo BIV em bovinos já foi detectada em gado leiteiro e de corte em vários países do mundo, com taxas de ocorrência que variam de 1,4 a 80%, dependendo do método de diagnóstico e fonte de amostras. Embora os estudos de ocorrência já tenham progredido muito em bovinos, em bubalinos, até o presente momento, não há relato na literatura do isolamento do vírus e existem apenas dois estudos sorológicos, com confirmação molecular, um no Paquistão (MEAS *et al.*, 1999) e outro no Camboja (MEAS *et al.*, 2000).

Devido à ampla distribuição mundial do BIV, a escassez de dados na literatura e a ausência de estudos em bubalinos no Brasil, o objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência da infecção, através da detecção molecular, pelo vírus da imunodeficiência bovina em búfalos do estado do Pará.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

A coleta de material biológico foi realizada em 10 propriedades rurais cada uma pertencente a um município do estado do Pará, Norte do Brasil (propriedades: A - Abaetetuba, B - Cachoeira do Arari, C - Castanhal, D - Ipixuna, E - Nova Timboteua, F - Ponta de Pedra, G - Porto de Moz, H – Salvaterra, I – Soure, J - Vigia). As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Retrovírus (RetroLab) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

2.2 AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletadas 607 amostras de sangue de bubalinos, de ambos os sexos, das raças Murrah, Jafarabadi e mestiços, com idade acima de quatro anos, criados em sistema extensivo de pastagem. Essas amostras foram coletadas por meio da punção da veia jugular, em tubos a vácuo (*Vacutainer*®), com capacidade para 4 ml, contendo anticoagulante ácido etilenoamino tetra-acético (EDTA). Os tubos foram identificados e encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foram centrifugados a 1600 g durante 10 minutos para separação da camada leucocitária. A camada foi retirada, armazenada a -20° C e enviadas ao RetroLab para posterior processamento molecular.

2.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO PROVIRAL

O DNA genômico total da camada leucocitária foi extraído utilizando-se o 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 membrana existente na coluna e o restante é eliminado através de duas etapas de lavagem e centrifugação. O DNA foi posteriormente eluído com tampão de eluição 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 1.

2.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

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. Para comparação visual e cálculo estimado da quantidade de DNA, foi utilizado um marcador padrão de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen).

O DNA foi aplicado no gel e submetido à eletroforese por 45 minutos a uma voltagem constante de 120V 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). A quantidade ótima de DNA utilizada nas reações foi definida entre 200 e 300 ng por reação.

2.5 REAÇÕES EM CADEIA DA POLIMERASE (PCRs)

2.5.1 PCR para o gene normalizador 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-se oligonucleotídeos iniciadores segundo Pinheiro de Oliveira *et al.* (2013). Os iniciadores estão apresentados na Tabela 1. 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 um volume final de 25μL.

Tabela 1: *Primers* para o GAPDH

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

F= Forward e R= Reverse Pinheiro de Oliveira *et al.*, 2013

Como controle negativo foi utilizado apenas o *master mix* de reagentes da PCR acrescido de 2 µL de água ultra pura estéril. A reação ocorreu no termociclador modelo *Veriti™ 384 well* (*Applied Biosystems*, EUA) e consistiu em uma desnaturação inicial de 95°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, hibridização de 54°C por 30 segundos, extensão de 72° C por 50 segundos, e uma extensão final de 72° C por 7 minutos, amplificando um fragmento de 709 pb. Os produtos da reação foram avaliados em gel de agarose, conforme descrito no item 2.4.

2.5.2 PCR e PCR *Semi Nested* (PCR-SN) para o BIV

A detecção do DNA proviral do BIV presente nas amostras de campo foi conduzida através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores, descritos por Rodrigues *et al.* (2014), para amplificar parte da região conservada do gene *pol* do vírus, empregando-se os iniciadores BIV F (5' CCCTCCAGGAATTAAGGAATG 3') e BIV R (3' TCACTTTCTCTTCCTGGACCTT 5') 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 µL de *Green GoTaq® Flexi Buffer 5x* (Promega, EUA), 2 µL 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 por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 94° C por 40 segundos, hibridização de 54°C por 40 segundos, extensão de 72° C por 40 segundos, e uma extensão final de 72° C por 4 minutos.

A PCR *SemiNested* foi conduzida conforme descrito por Rodrigues *et al.* (2014), empregando-se o iniciador interno BIV *SNested* e o externo BIV R (5'

AGCCACCCAGACATCATGTT 3’), amplificando um fragmento da região mais interna do gene *pol* de tamanho 154pb. Dois μL do produto amplificado na primeira reação (PCR) foram utilizados como *template* na segunda reação, em uma solução *master mix* constituída por 5 μL de *Green GoTaq[®] Flexi Buffer 5x* (Promega, EUA), 2 μL de cada iniciador (BIV SNested e BIV R, 10pmol/ μL – Invitrogen, EUA), 0,5 μL de dNTP *mix* (10mM – Promega, EUA) 1,5 μL de MgCl_2 (10mM – Promega, EUA), 0,1 μL 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 25 μL .

A reação foi conduzida em termociclador modelo *Veriti[™] 384 well* (*Applied Biosystems*, EUA) com desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 94° C por 30 segundos, hibridização de 58°C por 30 segundos, extensão de 72° C por 30 segundos e uma extensão final de 72° C por 4 minutos; 20 μL do produto da reação foram resolvidos em gel de agarose, conforme descrito no item 2.4.

2.6 CONTROLE POSITIVO

Foi utilizado como controle positivo para a PCR-SN um plasmídeo contendo parte do gene *pol*, padrão do RetroLab, gentilmente cedido pela pesquisadora Ana Paula Rodrigues.

2.7 CLONAGEM

2.7.1 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. A reação de ligação foi incubada a 4°C durante 12 horas e posteriormente utilizada para transformar células competentes da linhagem DH5 α de *Escherichia coli* (Promega). Dez μL da reação de ligação foram adicionados a 100

μL 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 μL de meio Luria-Bertani (LB) por uma hora à 37°C e 300 rpm. Após este período, 100 μL das culturas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$), IPTG (0,1mM) e XGal (50 $\mu\text{g/ml}$) e incubadas a 37°C durante 12 horas. Bactérias eficientemente transformadas são resistentes à 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 $\mu\text{g/ml}$) 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 clonado (vetor pGEM), foi aliquotado e armazenado separadamente a -20 e -80°C. Para confirmação da presença do inserto no plasmídeo, a PCR-SN descrita acima foi realizada.

2.7.2 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 μL . 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.

2.7.3 Análise Molecular

A montagem dos contigs e definição das sequências consenso de cada amostra foram realizadas utilizando-se o programa SeqScape Versão 2.7 (Applied Biosystems, EUA), utilizando-se como referência a sequência do genoma completo do BIV depositada no

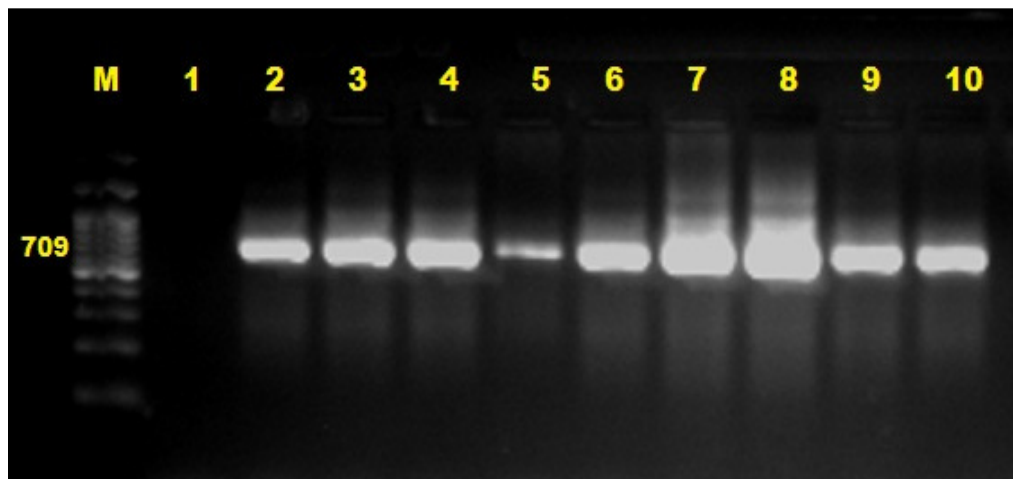
GenBank sob o número de acesso M32690.1. A edição, o alinhamento e a análise das sequências consenso geradas foram feitas através do programa MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011) utilizando-se os valores padrão para alinhamento. As sequências de polimerase da região pol do BIV para comparação com as obtidas neste trabalho foram selecionadas a partir de busca no programa BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As sequências selecionadas foram: R-29 (L04972.1), FL112 (L06524.1) e FL491 (L06525.1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato da infecção em bubalinos no País. Não existem estudos anteriores relatando a presença do BIV em búfalos no Brasil. Apesar de já terem sido realizados dois trabalhos, o primeiro nos municípios de Campo Grande – MS e Pelotas – RS e o segundo na Zona da Mata e Central do estado de Minas Gerais, relatando a ocorrência da infecção em bovinos (MEAS *et al.*, 2002; RODRIGUES, 2014).

A fim de avaliar a eficácia da extração de DNA, o material genético extraído da camada leucocitária do sangue de bubalinos 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 (Figura. 1), como o esperado de acordo com os iniciadores descritos por Pinheiro de Oliveira *et al.*, (2013).

Figura 1: Amplificação do gene GAPDH do DNA das amostras extraídas da camada leucocitária de búfalos em eletroforese em gel de agarose 1,5%. M: Padrão de tamanho molecular de 100pb. 1: Controle negativo. 2-10: Produto de PCR para amplificação do gene GAPDH.

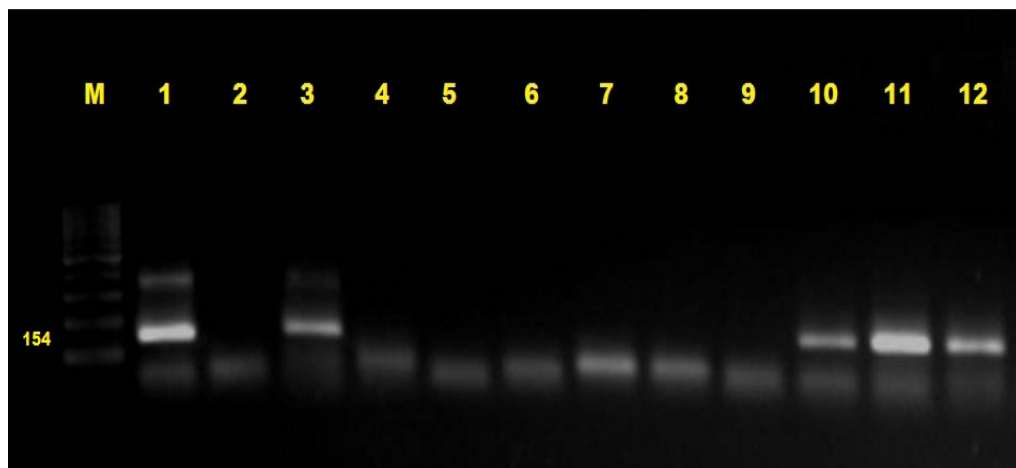


Fonte: o autor

Por meio da análise dos resultados obtidos, a detecção do gene GAPDH foi possível em 590 (97,2%) das 607 amostras testadas. 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, o que aumentou assim a confiabilidade dos testes e diminuiu a possibilidade de resultados falsos negativos por ausência ou degradação de DNA.

Das 607 amostras de sangue de búfalos testadas na PCR-SN para o BIV, 27 (4,4%) amplificaram o fragmento alvo de tamanho 154bp (Figura. 2). Essa ocorrência de 4,4% foi diferente da observada em búfalos no Paquistão (10,3%) (MEAS *et al.*, 2000a) e no Camboja (16,7%) (MEAS *et al.*, 2000b), que utilizaram o *Western blotting* como método de diagnóstico.

Figura 2: Amplificação do gene *pol* do DNA das amostras extraídas da camada leucocitária de búfalos através da PCR-SN em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M - Padrão de tamanho molecular de 100 pb. 1 - Controle positivo. 2 - Controle negativo. 3, 10, 11 e 12 - Amostras positivas. 4 a 9 - Amostras negativas.



Fonte: o autor

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 do BIV nos rebanhos (TAJBAKSHI *et al.*, 2010). Estudo de Jacobs *et al.* (1998) indicaram discordância entre a detecção sorológica e a molecular do BIV, onde a detecção por PCR apresentou maior

sensibilidade, fornecendo evidências de que os resultados da PCR tem uma confiabilidade maior do que outros métodos publicados (GONZALEZ *et al.*, 2000).

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 dos diferentes testes de PCR (SUAREZ E WHETSTONE, 1997).

Diante disto, o estudo do BIV encontra dificuldades pela ausência de um teste simples, rápido e eficaz, principalmente quando o número de animais estudados é grande. Uma técnica de detecção direta é necessária ao diagnóstico da doença, 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 *et al.* (2008) antes de serem retirados do mercado.

Nos últimos anos, a técnica molecular se tornou uma ferramenta muito importante na detecção direta de patógenos, por ser um método rápido, altamente específico, sensível e por poder detectar uma quantidade muito pequena de DNA em um intervalo de tempo relativamente curto (TAKIUCHI *et al.*, 2003).

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.*, 1997a; 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).

Ao realizar a análise das propriedades e dos percentuais de infecção entre elas (Tab. 2), verificou-se que as propriedades E, I e J tiveram maior ocorrência da doença com média de 12,3%. Essa taxa pode ser justificada pelo manejo adotado, visto que nessas propriedades apesar dos animais serem criados de forma extensiva eles são trazidos frequentemente para o curral, onde ocorre a realização de vacinação, vermifugação, diagnóstico de gestação, coleta de sangue para exames de brucelose, tuberculinização, entre outros procedimentos que favorecem a aglomeração dos mesmos. Logo, um maior contato entre esses animais através da

troca de secreções e fluídos corporais pode permitir um mecanismo de transmissão horizontal da doença. Além do que pode ter ocorrido a transmissão por via iatrogênica, uma vez que podem ter sido compartilhadas agulhas e outros materiais utilizados em exames clínicos e reprodutivos.

Essas observações também foram feitas por St Cyr Coats *et al.* (1994), que acrescentam que os fatores ambientais, tais como a presença de insetos hematófagos, também podem proporcionar mecanicamente a transmissão do vírus e por Snider *et al.* (1997) que afirmaram que o tempo no qual o gado permanece aglomerado tem sido o principal meio para elevar o mecanismo de transmissão do vírus no rebanho.

Tabela 2 - Porcentagem de animais positivos para o BIV por propriedade do estado do Pará, testados através PCR-SN.

PROPRIEDADE	Nº ANIMAIS TESTADOS	Nº ANIMAIS POSITIVOS PARA BIV	PERCENTUAL
A	28	1	3,6
B	29	1	3,4
C	28	0	0,0
D	95	4	4,2
E	35	5	14,3
F	40	0	0,0
G	183	1	0,5
H	95	5	5,3
I	61	9	14,8
J	13	1	7,7
TOTAL	607	27	4,4

As propriedades C e F não apresentaram nenhum animal positivo para o BIV; e a propriedade G apresentou a menor porcentagem de ocorrência da doença (0,5%). A ausência de animais positivos nas propriedades C e F e a baixa ocorrência observada na propriedade G também podem ser explicadas pelo manejo adotado nessas propriedades. Apesar da propriedade C ser localizada no município de Castanhal, esses animais eram provenientes de uma fazenda da Ilha do Marajó, onde o sistema de criação é realizado semelhante ao das

propriedades F e G, de maneira ultra-extensiva, onde o gado é criado livremente sem a presença de cercas e dificilmente tem acesso ao curral para procedimentos sanitários, isso poderia dificultar a disseminação do vírus no rebanho.

Essas observações também foram feitas por Rodrigues (2014) em bovinos, que justifica a baixa ocorrência do BIV (1%) em uma propriedade no estado de Minas Gerais devido a forma de criação extensiva do rebanho.

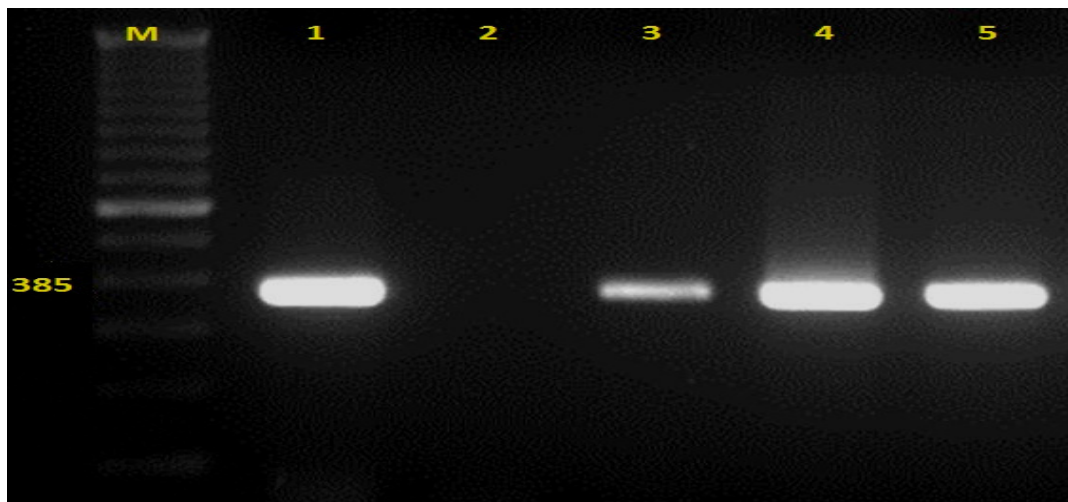
Ao analisar a ocorrência e distribuição mundial do BIV percebe-se que o percentual de 4,4% observado nesse estudo foi moderadamente semelhante aos estudos sorológicos realizados na França (4%), Polônia (4,9%), Reino Unido (5,5%), Canadá (5,5%) e Alemanha (6,6%). Sendo superior somente aos percentuais dos estudos sorológicos realizados na Holanda (1,4%) e Itália (2,5%). Países como Zâmbia (11,4%), Japão (11,7%), Brasil (11,7%), Argentina (12%), Turquia (12,3%), e Nova Zelândia (13,5%), 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), Coreia (34%) e Venezuela (66%) apresentaram percentuais superiores, em inquéritos sorológicos, do observado em nosso estudo. Outros países como Índia (8,8%), Brasil (12,5%) e Irã (60%) também apresentaram percentuais superiores aos observados em nosso estudo utilizando a PCR.

Observa-se que a doença ocorre com maior frequência na Europa e na Ásia. Os búfalos foram introduzidos no Brasil a partir do final do século XIX, através de sua região Norte em pequenos lotes originários da Ásia, Europa e Caribe, levando em consideração que os búfalos importados já poderiam estar infectados com o BIV, pode haver evidências de que ao vírus da imunodeficiência bovina já esteja presente no rebanho brasileiro há muito tempo, porém, somente agora foi diagnosticado.

As sequências nucleotídicas dos DNAs plasmidiais de três prováveis clones positivos 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. 3). As construções nos vetores de clonagem foram denominadas de PA280, PA519 e PA3257.

Os resultados das sequências do fragmento *pol* do BIV foram analisadas utilizando-se 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.

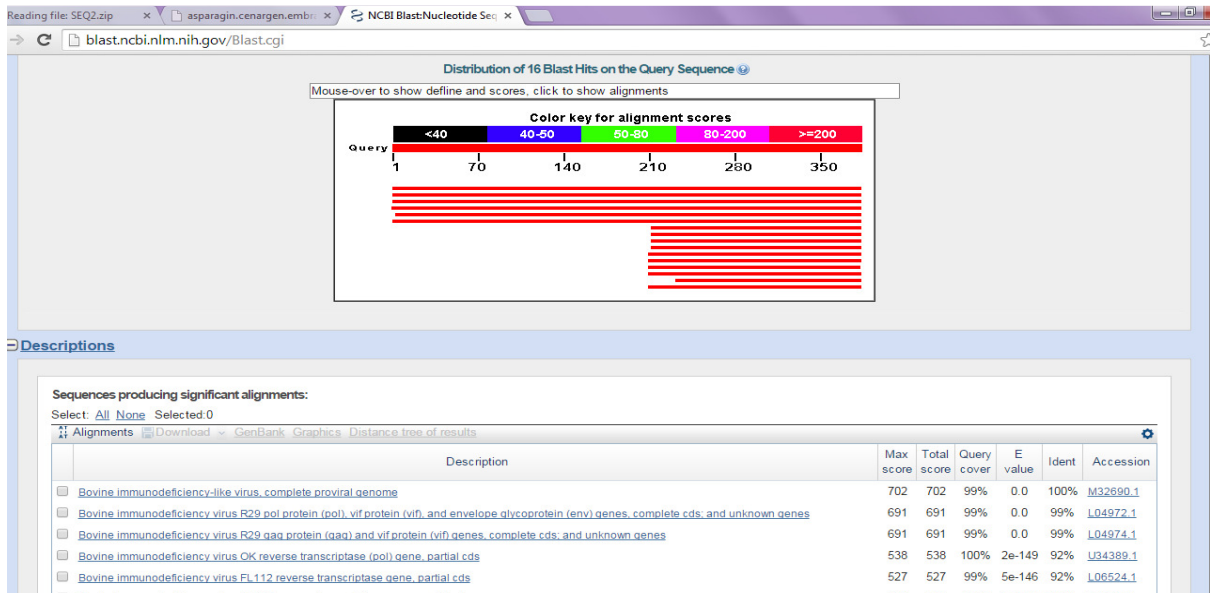
Figura 3: Amplificação de fragmentos *pol* clonados em plasmídeos *pGEM* a partir das amostras extraídas da camada leucocitária de búfalos através da PCR em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio. M: Padrão de tamanho molecular de 100 pb. 1: Controle positivo. 2: Controle negativo. 3: Clone PA280. 4: Clone PA519. 5: Clone PA3257.



Fonte: o autor

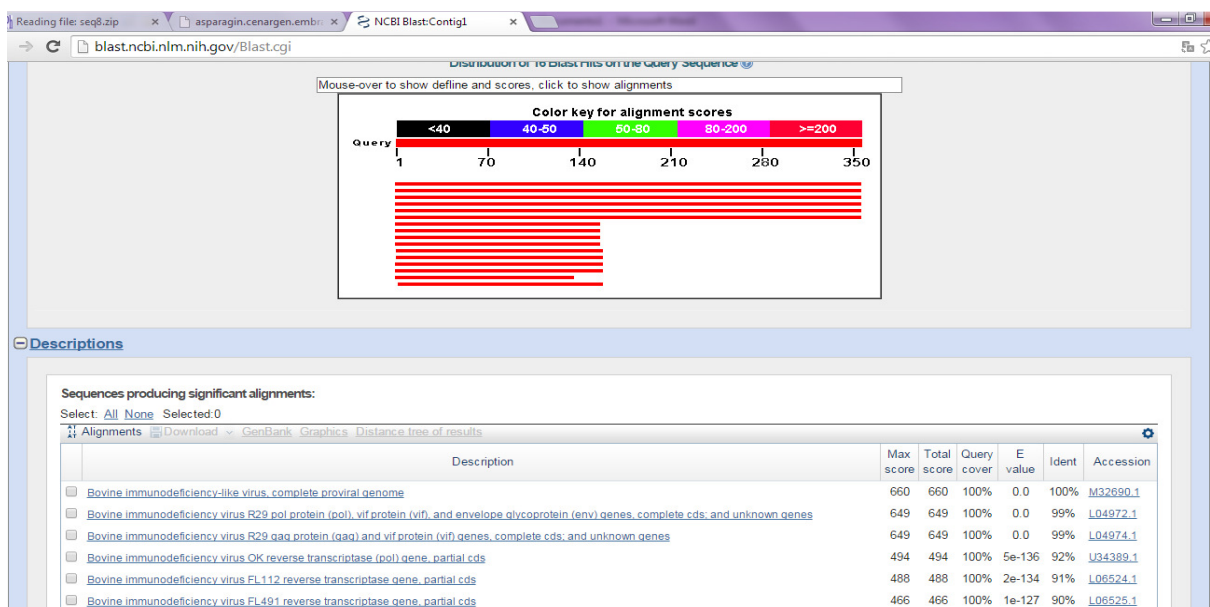
As sequências obtidas neste trabalho confirmam a identidade dos genes de acordo com a alta similaridade encontrada com sequências *pol* BIV já depositadas no *GenBank*, e mostraram alta similaridade (99%) com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus, a cepa R-29 (Figuras. 4, 5 e 6). Esse fato permitiu concluir a origem viral do inserto e o sucesso obtido na clonagem.

Figura 4. Confirmação da identidade do clone PA280 com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus da imunodeficiência bovina, a cepa R-29, depositada no *GenBank*, mostrando alta similaridade (99%), através do software público BLAST



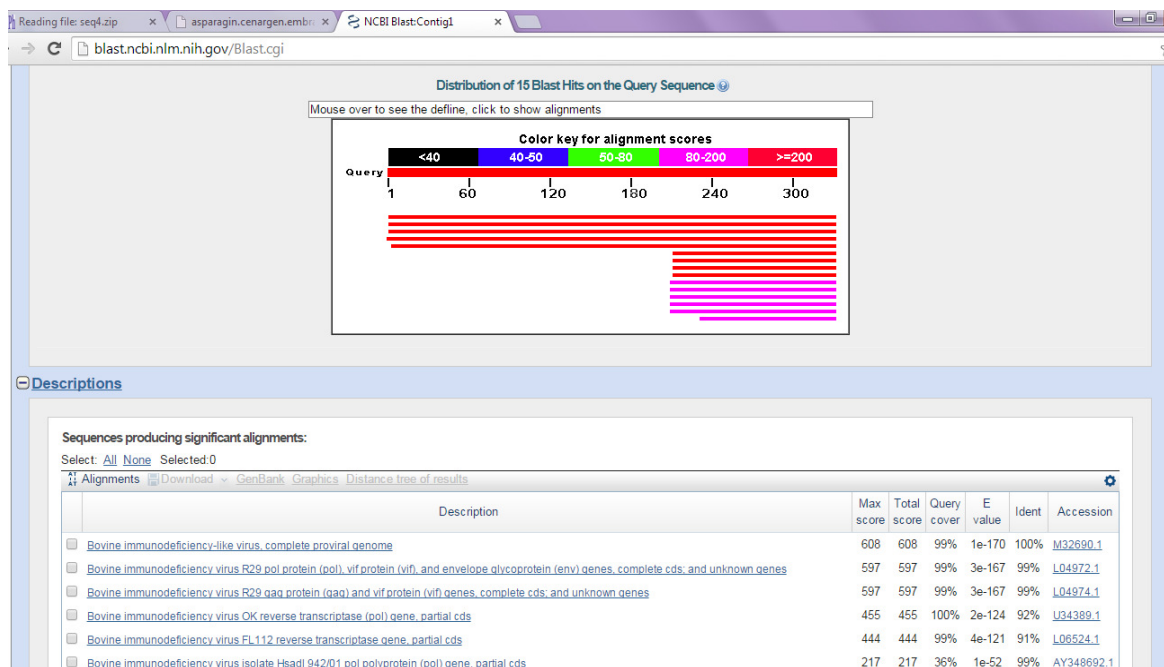
Fonte: adaptado do software público BLAST

Figura 5. Confirmação da identidade do clone PA519 com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus da imunodeficiência bovina, a cepa R-29, depositada no *GenBank*, mostrando alta similaridade (99%), através do software público BLAST



Fonte: adaptado do software público BLAST

Figura 6. Confirmação da identidade do clone PA3257 com a sequência nucleotídica da estirpe americana do vírus da imunodeficiência bovina, a cepa R-29, depositada no *GenBank*, mostrando alta similaridade (99%), através do software público BLAST



Fonte: adaptado do software público BLAST

Meas *et al.* (2002) comprovaram que as amostras brasileiras amplificadas da região *pol* do BIV também apresentaram alta homologia 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 permite fazer com que as sequências brasileiras sejam as primeiras a serem depositadas no banco de dados, 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.

Epidemiologicamente, este estudo fornece dados iniciais necessários, informando que a presença do BIV no estado do Pará pode ser considerada como um fator de risco para a saúde das populações de búfalos, e um potencial agente causador de doença crônica, como relatada em outros países ao redor do mundo. Desta forma, é necessário que um amplo estudo de prevalência, epidemiologia e patogênese seja realizado para verificar o real papel do BIV em búfalos.

4 CONCLUSÃO

Esse é o primeiro relato da ocorrência do BIV em búfalos no Brasil.

Das 10 propriedades testadas, oito apresentaram resultados positivos na PCR-SN para a ocorrência do BIV em búfalos no estado do Pará, em um percentual que variou de 0,5 a 14%.

A amostragem de 607 bubalinos testados para o BIV na PCR-SN revelou 4,4% de animais positivos.

Com base nos resultados da PCR-SN verificou-se que o BIV ocorre nos rebanhos bubalinos estudados no estado do Pará.

Faz-se necessário a realização de um amplo estudo epidemiológico para determinar a patogênese e a prevalência da imunodeficiência viral bovina em búfalos.

5 PERSPECTIVAS

O prosseguimento do trabalho com os clones positivos obtidos a partir do plasmídeo das amostras de campo podem objetivar as seguintes tarefas: estudar a filogenia das amostras brasileiras; caracterizar molecularmente o vírus circulante no país; delinear os oligonucleotídeos iniciadores para outras regiões do vírus; estudar a co-infecção entre o BIV e outras doenças que podem ser decorrentes da imunossupressão induzida pelo BIV; verificar a prevalência do vírus no estado do Pará; desenvolver um teste sorológico para o diagnóstico do BIV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLAKHA, S.C.; SHARMA, S.N. Infectious diseases. In: TULLOH, N.M.; HOLMES, J.H.G. (Ed.). **Buffalo Production**. Amsterdam: Elsevier, 1992.p.271-297.
- ALKHATIB, G. et al. CC CKR5: MIP1- α , MIP1- β receptor as a fusion cofactor for macrophagetropic HIV-1. **Science**, n.272, p. 1955–1958,1996.
- AMBORSKI, G.F.; L.O, J.; SEGER, C.L. Serological detection of multiple retroviral infections in cattle: bovine leukemia virus, bovine syncytial virus and bovine visna virus. **Veterinary Microbiology**, v. 20, p. 247-253, 1989.
- ANDREWS, A.H; BLOWYW; BOYD, H.; EDDY, R.G. **Bovine Medicine**.2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2004. p. 693-700.
- ANDREWS, A. H. et al. **Medicina Bovina: doença e criação de bovinos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.1080p.
- BARBONI, P. et al. Evidence for the presence of two bovine lentiviruses in the cattle population of Bali. **Veterinary Microbiology**,v. 80, p. 313-327, 2001.
- BELLOCK, C. et al. Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. **Veterinary Research**, v. 27, p. 395-402, 1996.
- BHATIA, S.; PATIL, S.S.; SOOD, R. Bovine Immunodeficiency virus: a lentiviral infection. **Indian Journal of Virology**, v. 24, n. 3, p. 332-341, 2013.
- BORROW, P. et al. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. **Nature Medicine**,n. 3, p. 205-11, 1997.
- BRAUN, M.J. et al. Molecular cloning of biologically active proviruses of bovine immunodeficiency-like virus.**Virology**, v. 167, p. 515-523, 1988.
- BRUJENI, G.K. et al. Bovine Immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle.**Journal of Infection in Developing Countries**,v. 4, n. 9, p. 576-579, 2010.
- BURNS, D.P.; DESROSIERS, R.C. Envelope sequence variation, neutralizing antibodies, and primate lentivirus persistence.**Current Topics in Microbiology and Immunology**,v. 188, p. 185-219, 1994.
- CARPENTER, S. et al. Characterization of early pathogenic effects after experimental infection of calves with bovine immunodeficiency-like virus. **Journal of Virology**, v. 66, p. 1074–1083, 1992.
- CARPENTER, S. et al. Antigenic and genetic stability of bovine immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infected with BIV (R29) isolate. **Journal of General Virology**, v. 81, p.1463–1472, 2000.

- CARTER, C.A.; EHRLICH, L.S. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 425-43, 2008.
- CAVIRANI, S. et al. Seroprevalence to bovine immunodeficiency virus and lack of association with leukocyte counts in Italian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v.37, p.147-157, 1998.
- CLAYTON, J. Spectre of AIDS haunts reports of sick cows. **Nature (Lond.)**, v. 1.p. 367-585, 1994.
- CHO, K.O. et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus in dairy and beef cattle in Korea.**Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, p. 549-551, 1999.
- COCKERELL, G.L. et al.Seroprevalence of bovine immunodeficiency-like virus and bovine leukemia virus in a dairy cattle herd.**Veterinary Microbiology**,v. 31, p. 109-116, 1992.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**,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. **Current HIV Research**, v. 8, p. 2-13, 2010.
- DAFFNER, J.; SCORTTI, M. Bovine immunodeficiency virus.**Arquivos de Medicina Veterinária**,v. 29, n. 1, p.5-11, 1997.
- DESPOINT, M.; MCLACHLAN, S. **The Bovine Lentiviruses: pathogenesis and Cell Tropism**. Norfolk: Caister Academic Press, 2010.p. 309 – 310.
- DESROSIERS, R.C. Nonhuman Lentiviruses. In: D.M.H.P.M KINIPE (Ed.), **Fields Virology**. 5th ed. [S.I.]: Lippincott Williams and Wilkins.2007. p. 2216-43.
- FORMAN, A.J.; GIBSON, C.A.; RODWELL, B.J. Serological evidence for the presence of bovine lentivirus infection in cattle in Australia. **Australian Veterinary Journal**,v. 69, p. 337, 1992.
- FLAMING, K. et al. Effect of bovine immunodeficiency-like virus infection on immune function in experimentally infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**,v. 36, p. 91-105, 1993.
- FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria,2007. 888p.
- GARVEY, K. et al. Nucleotide sequence and genome organization of biologically active provirus of the bovine immunodeficiency-like virus.**Virology**,v. 175, p. 391-409, 1990.
- GENG, Y.; KASHANCHI, F.; WOOD, C. Activation of bovine immunodeficiency-like virus expression by bovine herpesvirus type 1.**Virology**,v.187, p. 832–836, 1992.

GONDA, M.A.; OBERSTE, M.S. AIDS the human immunodeficiency virus: molecular and structural aspects of its biology. In: KURSTAK, E. (Ed.). **Control of virus diseases**, New York, 1992, p. 3-31.

GONDA, M.A. et al. Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and host interactions. **Virus Research**, v. 32, p. 155-181, 1994.

GONZALEZ, G.C. et al. Very low prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in western Canadian cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 73-76, 2000.

GONZÁLEZ, E.T. et al. Evidence of bovine immunodeficiency virus (BIV) infection: Serological survey in Argentina. **Research in Veterinary Science**, v. 85, p. 353-358, 2008.

GRADIL, C.M. et al. Detection of bovine immunodeficiency virus DNA in the blood and semen of experimentally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, 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 Symposium**, 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. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 42, n. 3, p. 155-161, 1995.

HIRAI, N. et al. Immunomodulative effects of bovine immunodeficiency-like virus (BIV)-infection and mixed infection of BIV and bovine leukemia virus on sheep. **Japanese Journal of Veterinary Research**. v.44, p. 153-163, 1967.

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. et al. Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2923-2928, 1991.

JACOBS, R. M. et al. Prevalence of bovine immunodeficiency-like virus in bulls as determined by serology and proviral detection. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 231-233, 1998.

LEITE, R.C. et al. Retrovíroses dos animais domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 73-92, 2013. Edição comemorativa.

MARTIN, S.J. et al. Lymphocyte transformation abnormalities in bovine immunodeficiency-like virus infected calves. **Immunology Letters**, v. 27, p. 81-84, 1991.

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. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 36-41, 1994.

MEAS, S. et al. Seroprevalence and Field Isolation of Bovine Immunodeficiency Virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 1195-1202, 1998.

MEAS, S. et al. Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 329-331, 2000a.

MEAS, S. et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, p. 779-781, 2000b.

MEAS, S. et al. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 50, p. 9-16, 2002.

MEAS, S. et al. Evidence of bovine immunodeficiency virus in cattle in Turkey. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 51, p. 3-8, 2003.

MEAS, S. et al. Evidence for bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 52, p. 3-8, 2004.

MOANNA, A. et al. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: killed by friendly fire? **Current HIV/AIDS Reports**, v. 2, p. 16-23, 2005.

MOODY, C.A. et al. Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 113-119, 2002.

MOMTAZ, H.; TAJBAKSH, E.; MOMENI, M. Cloning and phylogenetic analysis of bovine immune deficiency virus *env* gene in Iranian isolates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, p. 492-496, 2010.

MORIUCHI, H.; MORIUCHI, M.; FAUCI, A.S. Factors secreted by human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) – infected cells can enhance or inhibit replication of HIV-1 in HTLV-I – uninfected cells: implication for in vivo coinfection with HTLV-I and HIV-1. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 1689-1697, 1998.

MULUNEH, A. Seroprevalence of bovine immunodeficiency-virus (BIV) antibodies in the cattle population in Germany. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 41, p. 679-684, 1994.

MURPHY, F.A. et al. **Veterinary Virology**, 3th ed. San Diego: Academic Press, 1999, p. 363-389.

NADIN-DAVIS, S.A. et al. Detection of bovine immunodeficiency-like virus by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 42, p. 323-336, 1993.

NARAYAN, O. et al. Neutralizing antibody spectrum determines the antigenic profiles of emerging mutants of visna virus. **Infection and Immunity**, v. 32, p. 1045-50, 1981.

NASH, J.W.; HANSON, L.A.; ST. CYR COATS K. Detection of bovine immunodeficiency virus in blood and milk-derived leukocytes by use of polymerase chain reaction. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 445-449, 1995.

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

OBERSTE, M.S.; GREENWOOD, J.D; GONDA, M.A. Analysis of the transcription pattern and mapping of the putative and env splice junctions of bovine immunodeficiency-like virus .**Journal of Virology**, v.65, p. 3932–3937, 1991.

OLIVER, D. et al. Polymerase Chain Reaction and Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. In: **Molecular Pathology of Lung Diseases**. New York: Springer Science Business Media,2007. v. 1, cap. 9, p. 83-96.

ONUMA, M. et al.Infection and dysfunction of monocytes induced by experimental inoculation of calves with bovine immunodeficiency-like virus.**Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 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. **Preventive Veterinary Medicine**,v. 61, n. 2, p.79-89, 2003.

PATIL, S.S. et al. Detection of proviral genomic sequence of bovine immunodeficiency virus in Indian cattle. **Current Science**, v. 84, n. 4, 2003.

PALLANSCH, L.A.; LACKMAN-SMITH, C.S.; GONDA, M.A. Bovine immunodeficiency-like virus encodes factors which trans activate the long terminal repeat. **Journal of Virology**,v. 66, p. 2647–2652, 1992.

PAYNE, S.L. et al. Antigenic variation and lentivirus persistence: variations in envelope gene sequences during EIAV infection resemble changes reported for sequential isolates of HIV. **Virology**, v. 161, p. 321-31, 1987.

OLIVEIRA, P.T.F. et al. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. **Biologicals**, v. 41, p. 407-414, 2013.

POLACK, B. et al. Serologic evidence for bovine immunodeficiency virus infection in France.**Veterinary Microbiology**,v. 48, p. 165-173, 1996.

RADOSTITIS, O.M.; DONE, S.H.; BLOOD, D.C. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**.10th ed. London: SaundersElsevier, 2007. p. 1046-1058, 1213, 1221-1223.

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.

RODRIGUES, A.P.S. **Detecção molecular do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em bovinos do estado de minas gerais**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ROLA-LUSZCZAK, M.; KOZACZYNSKA, B.; KUZMAK, J. Serological survey for bovine immunodeficiency virus in dairy cattle from Poland. **Journal of Veterinary Science**,v. 14, n. 4, p. 579-583, 2011.

SCOBIE, L. et al. Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 149, p. 459-460, 2001.

SENEGAGLIA, A.C. et al. In vitro formation of capillary tubules from human umbilical cord blood cells with perspectives for therapeutic application. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 4, p. 467-473, 2008.

SOMMERFELT, M.A. Retrovirusreceptors. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 3049–3064, 1999.

SNIDER, T.G. et al. Encephalitis, lymphoid tissue depletion and secondary diseases associated with bovine immunodeficiency virus in a dairy herd. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.19, p.117–131, 1996.

SNIDER, T.G. et al. Natural and experimental bovine immunodeficiency virus infection in cattle. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.13, p. 151–176, 1997.

ST CYR COATS, K. et al. Bovine immunodeficiency virus: incidence of infection in Mississippi dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, 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. **Animal Health Research Reviews**, 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. **Archives of Virology**, v. 150, p. 1529-1547, 2005.

STAROSCIK, A. **Calculator for determining the number of copies of a template**. Disponível em: <<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>>. Acesso em: fev. 2014.

SUAREZ, D.L. et al. Isolation and Characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 8, p. 5051-5055, 1993.

SUAREZ, D.L.; WHETSTONE, C.A. Identification of hypervariable and conserved regions in the surface envelope gene in the bovine lentivirus. **Journal of Virology**, v.212, p. 728-733, 1995.

SUAREZ, D.L.; WHETSTONE, C.A. Size variation within cattle. **Journal of Virology**, v. 64, p. 3557-3561, 1997.

SU, Y. et al. Microtubule-dependent retrograde transport of bovine immunodeficiency virus. **Celular microbiology**, v.12, p.1098-1107, 2010.

SZABO, J. et al. Differential patterns of interaction between HIV type 1 and HTLV type I in monocyte-derived macrophages cultured in vitro: implications for in vivo coinfection with HIV type 1 and HTLV type I. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 15, p. 1653-1666, 1999.

- TAJBAKHS, E. et al. Molecular prevalence for bovine immunodeficiency virus infection in Iranian cattle population. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 12, p. 1199-1202, 2010.
- TAJIMA, M. et al. Distribution of bovine Immunodeficiency virus in the organs of experimentally infected cows. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 163-167, 1997.
- TAKIUCHI, E. 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. **Semina: ciencias agrarias**, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.
- TAMURA, K. et al. MEGA5. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** [Epub ahead of print], 2011.
- TERZIEVA, V.; REGULATORY, T. Cells and HIV-1 infection. **Viral Immunology**, v. 21, p. 285-91, 2008.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3: new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 115, 2012.
- VAN DER MAATEN, M.J.; BOOTH, A.D.; SEGAR, C.L. Isolation of virus from cattle with persistent lymphocytosis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 49, p. 1649-1657, 1972.
- WALDER, R. et al. Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies. **Research in Virology**, v. 146, p. 313-323, 1995.
- WATSON, S. 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. **Virology Journal**, v. 4, p. 130, 2007.
- WHETSTONE, C.A. et al. Bovine lentivirus induces early transient B-cell proliferation in experimentally inoculated cattle and appears to be pantropic. **Journal Virology**, v. 71, p. 640-644, 1997.
- WRIGHT, S.M.; MLECZKO, A.; COATS, K.S. Bovine immunodeficiency virus expression *in vitro* is reduced in the presence of beta-chemokines, MIP-1alpha, MIP-1beta and Rantes. **Veterinary Research Communications**, v.26, p. 239-250, 2002.
- WU, L. et al. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v.185, p. 1681-1691, 1997.
- YILMAZ, Z.; YESILBAG, K. Clinical and Hematological findings in bovine immunodeficiency virus (BIV) Infected cattle. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 32, p.207-214, 2008.

YIN, H. et al. Inactivation of bovine immunodeficiency virus by photodynamic therapy with HMME. **Chinese Optics Letters**, v. 6, n. 12, p. 944-946, 2008.

ZHANG, S. 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, 1997a.

ZHANG, S. et al. Immune suppression in calves with bovine immunodeficiency virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.4, n.2, p. 232-235, 1997b.

ANEXO 1: Protocolo de extração de DNA de sangue e fluídos 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 20 μ l de QIAGEN Protease (ou Proteinase K) em um tubo de microcentrífuga de 1,5ml;
- 2) Adicionar 200 μ l de amostra no tubo de microcentrífuga.
 - Se o volume da amostra for menor que 200 μ l, adicionar volume adequado de PBS.
- 3) Adicionar 200 μ l de tampão AL na amostra. Vortetizar por 15 segundos.
 - Se o volume da amostra for superior a 200 μ l, aumentar a quantidade de QIAGEN Protease e tampão AL proporcionalmente. Ex.: 400 μ l de amostra = 40 μ l QIAGEN e 400 μ l 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 200 μ l 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 200 μ l, aumentar a quantidade de etanol proporcionalmente. Ex.: 400 μ l de amostra requer 400 μ l 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 cápsula 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 500 μ l 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 cápsula 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).