

## RT-PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA

CAETANO, C. F.<sup>1</sup>; FINGER, P. F.<sup>2</sup>; SIEDLER, B. S.<sup>2</sup>; MUNHOZ, \*L. S.<sup>2</sup>; VILELA, C. O.<sup>1</sup>; FERREIRA, L. N.<sup>1</sup>; FISCHER, G.<sup>3</sup>; VARGAS, G. A.<sup>4</sup>; VIDOR, T.<sup>4</sup>; HÜBNER, S. O.<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>*Pós-graduanda em Veterinária*

<sup>2</sup>*Estudante da graduação em Veterinária*

<sup>4</sup>*Pós-Doutorando em Veterinária UFRGS/UFPel*

<sup>5</sup>*Professor do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva*

### RESUMO

Descreve-se a técnica por RT-PCR para identificação do vírus da cinomose canina em treze amostras de animais suspeitos, uma amostra para o controle positivo para CDV que foi amplificada em células MDCK, uma amostra para o controle negativo (adicionado água ultra pura em vez do cDNA). O resultado obtido foi à amplificação da seqüência do gene P do CDV do tamanho esperado para oito das treze amostras testadas. Constatou-se que RT-PCR é um método molecular de diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade.

### INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (canine distemper virus - CDV) é um vírus envelopado, com genoma RNA fita simples e polaridade negativa. Pertence ao gênero Morbillivirus da família Paramixoviridae, e é considerado um dos mais importantes patógenos de cães domésticos (McCandlish, 2001).

O CDV é geralmente transmitido por aerossóis contaminados ao trato respiratório superior. A primeira replicação viral ocorre no tecido linfóide, promovendo uma severa e duradoura imunossupressão. Os linfócitos T são mais afetados do que os linfócitos B, sendo rapidamente depletadas as células CD4+. As células CD8+ são afetadas com menor severidade, sendo as que recuperam relativamente mais rápido (VANDEVELDE, 2004).

Em cerca de 10 dias, o CDVV inicia a disseminar a partir dos sítios de replicação primária para vários tecidos epiteliais e sistema nervoso central (SNC). Graças à disseminação e infecção das estruturas epiteliais pode ocorrer uma variedade de sinais respiratórios, gastrintestinais e dermatológicos. A complicação mais grave do CDV é decorrente da infecção do SNC, quando várias síndromes neurológicas podem ocorrer, a maioria com prognósticos desfavoráveis (VANDEVELDE, 2004).

A infecção produz severa doença e grande mortalidade, principalmente em filhotes com menos de três meses de idade, em virtude do sistema imune do animal ainda não está perfeitamente capacitado para suportar uma doença causada por um vírus altamente virulento (McCaw et al, 1998). Os sinais clínicos da enfermidade variam de acordo com a virulência da cepa viral, condições ambientais, idade e estado imunológico do hospedeiro, sendo que tosse, diarreia, vômitos, anorexia, desidratação, e perda de sangue com debilitação são comumente observados em cães com cinomose aguda. Corrimento oculonasal mucopurulento e pneumonia

freqüentemente resultam de infecções bacterianas secundárias. Uma erupção cutânea, progredindo para pústulas, pode ocorrer especialmente no abdômen e os sinais neurológicos começam uma a três semanas após a recuperação da doença sistêmica e incluem hiperestesia, rigidez cervical, convulsões, sinais cerebelares e vestibulares e ataxia (Swango, 1992).

Recentemente foi descrito a presença de linhagens de CDV distintas geograficamente, reveladas através de análise filogenética (Iwatsuki et al, 1997; Mochizuki et al, 1999; Lednicky et al, 2004). Algumas cepas de CDV utilizadas em vacinas comerciais no Brasil, como por exemplo Onderstepoort, Rockborn e SniderHill, foram produzidas ainda na década de 50 e 60, e análises antigênicas e moleculares demonstraram a existência de diferença entre essas e amostras atuais, isoladas no Japão e EUA (Gemma et al, 1996; Ohashi et al, 1998). No Rio Grande do Sul, especialmente na região de Pelotas, têm sido observados freqüentes e severos surtos de cinomose. Embora variações individuais de imunidade ou falha na vacinação não possam ser excluídas como causas da ocorrência desses quadros severos de cinomose, deve ser ressaltada a importância da avaliação da possibilidade de existência de cepas locais com características moleculares que resultem em acentuada virulência ou, talvez, com genótipo diferente das amostras vacinais.

O objetivo desse trabalho foi obter a amplificação do gene P do CDV a partir de amostras clínicas de animais suspeitos de cinomose. Futuramente serão caracterizadas molecularmente para avaliar a existência de diferenças genômicas entre amostras de CDV que circulam na região de Pelotas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletadas dez amostras de cérebro e pulmão e três amostras de sangue de animais suspeitos de cinomose para executar a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR). Das amostras dos órgãos uma parte do material foi armazenada em solução de formaldeído 10% e outra parte, aproximadamente, 100 mg de cada tecido foi macerado e homogeneizado em 1ml de Trizol®, sendo armazenado em eppendorf a -70° C. As amostras de sangue foram processadas até a obtenção de leucócitos, e, após centrifugações e lise das hemácias com cloreto de amônia, o pellet de leucócitos formado foi suspenso em 1ml de Trizol® e armazenado a -70° C.

As amostras armazenadas em formaldeído foram submetidas à análise histológica para investigar se os materiais apresentavam lesões sugestivas de cinomose. Quatro amostras de órgãos de animais diferentes apresentaram lesões no cérebro ou pulmões, tais como gemastócitos, espongirose e manguitos perivascularares, que seriam sugestivos da enfermidade. Com base na histopatologia foram separadas as quatro amostras com lesões, seis amostras sem lesão histológica e as três amostras de sangue para extração do RNA e análise molecular.

A extração de RNA foi realizada com Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen). Resumidamente, as amostras de tecido armazenadas com Trizol foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a 15 a 30°C para permitir a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio por ml de Trizol, e os tubos homogeneizados vigorosamente por 15 segundos e incubados a 15 a 30°C por 2 a 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 2 a 8°C. Após a centrifugação, a mistura

foi separada em três fases: uma vermelha, de fenol-clorofórmio, uma interfase, e uma incolor aquosa, correspondente àquela em que permanece o RNA. O isolado de RNA foi precipitado da fase aquosa misturando o álcool isopropílico (0,5 ml de álcool para cada 1 ml de Trizol). As amostras foram incubadas a 15 a 30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 2 a 8 °C. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA lavado com etanol 75%. As amostras foram misturadas através do vortex e centrifugadas a 7.500 x g por 5 minutos a 2 a 8 °C. Ao final do procedimento, o pellet de RNA foi seco brevemente e ressuspendido em água livre de RNase para padronização da quantidade de RNA entre as amostras, por espectrofotometria em absorbância 260 e 280.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se 5 µg do RNA total, em uma reação de 25 µl que conteve ainda 150 ng de “random” primers (Invitrogen), 1 µl de desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTP's – 10 mM), tampão de síntese (New England Biolabs), 0.1 M DDT, 40 U de RNaseOUT (Invitrogen) e 40 U de Transcriptase reversa M-MuLV (New England Biolabs), segundo a metodologia descrita (Ulett 2000). Após incubação por 10 min a 25 °C, as amostras foram incubadas a 42 °C por 50 min, e então por 70 °C durante 15 min, em termociclador (Biocycler - MJ96). O cDNA obtido foi estocado a -70 °C.

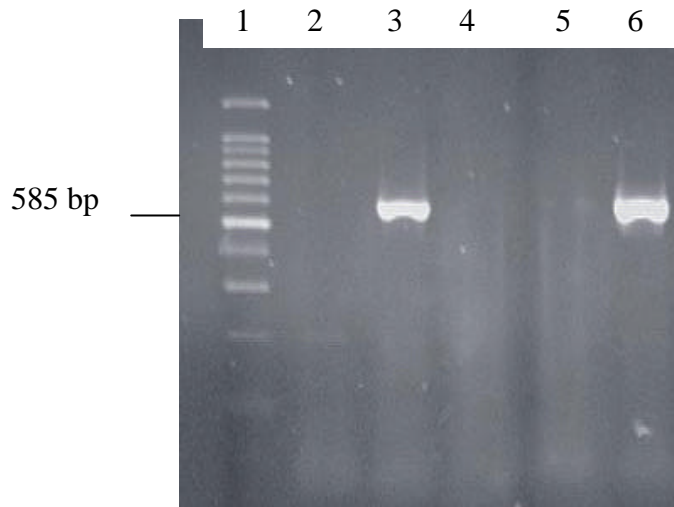
Foram selecionadas quinze amostras para efetuar a técnica, treze amostras eram de animais suspeitos de cinomose, uma amostra para o controle positivo para CDV que foi amplificada em células MDCK, uma amostra para o controle negativo (adicionado água ultra pura em vez do cDNA). Foram utilizados 2 µl de cDNA, 0,25 µl de dNTP (20 mM), tampão - PCR 1 X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3µl de Taq DNA polimerase (1,5 U), e água ultra pura autoclavada para o volume de 25 µl.

Os primers utilizados foram descritos no trabalho de Maes et al (2003) e sintetizados para amplificação de um segmento do gene que codifica a nucleoproteína P do CDV (gene P). O primer “forward” foi 5' AAG AGG TTA AGG GAA TCG 3', e o primer “reverse” 5' GAG AAA AGC TCA TCA TCG 3', resultando num produto de 585 pares de bases (bp).

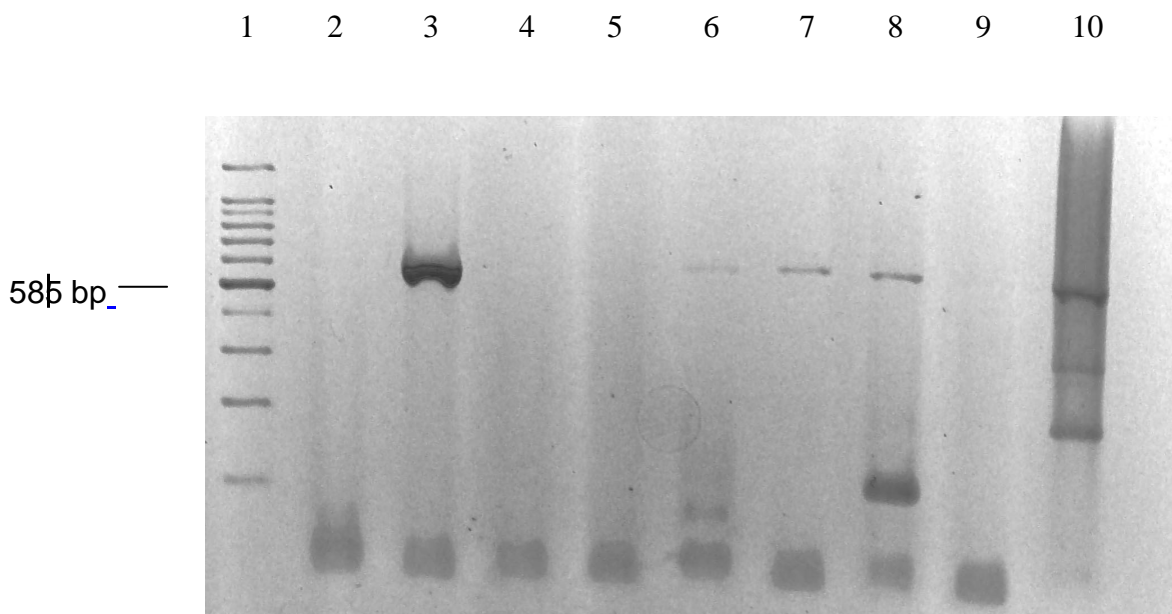
A reação foi executada no termociclador, utilizando as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1minuto; uma etapa de extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 Mm; pH 8,4), sob voltagem constante (180V) por aproximadamente 60 minutos. O gel foi corado em solução contendo 0,3 µl de brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido amplificação do tamanho esperado através da técnica de RT-PCR para oito das treze amostras de tecido e sangue testados. Nas Figuras 1 e 2 pode ser observada a amplificação obtida através da reação.



**Figura 1** – Eletroforese em gel de agarose de produtos da RT-PCR resultando na amplificação de CDV (gene P). Linha 1, marcador de peso molecular; Linha 2, amostra negativa; Linha 3, amostra positiva (cérebro); Linha 4, controle negativo; Linha 5, amostra negativa; Linha 6, amostra positiva (cérebro).



**Figura 2** – Eletroforese em gel de agarose de produtos da RT-PCR resultando na amplificação de CDV (gene P). Linha 1, marcador de peso molecular; Linha 2, amostra negativa; Linha 3, amostra positivo (leucócitos); Linha 4, amostra negativa; Linha 5, amostra negativa; Linha 6, amostra positiva (cérebro); Linha 7,

amostra positiva (cérebro); Linha 8, amostra positiva (cérebro); Linha 9, controle negativo; Linha 10, controle positivo.

## CONCLUSÕES

A RT-PCR é um método molecular de diagnóstico que, se adequadamente padronizado, apresenta alta sensibilidade e especificidade. No presente trabalho foi possível à obtenção dos resultados esperados, ou seja, amplificação de seqüência do gene P do CDV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GEMMA, T., IWATSUKI, Y-S., SHIN, E., et al. Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. **Journal Vet. Med. Sci.**, 1996, v. 58, p. 791-794.

IWATSUKI, K., MIYASHITA, N., YOSHIDA, E., et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. **Journal of General Virology**, 1997, v. 78, p. 373-380.

LEDNICKY, J.A., MEEHAN, T.P., KINSEL, M.J., et al. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. **Journal of Virological Methods**, 2004, v. 118, p. 147-157.

MAES, R.K., WISE A.G., FITZGERALD, S.D., RAMUDO, A., KLINE, J., VILNIS, A., BENSON, C.A. Canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. **Journal Vet Diagn Invest**, 2003, v. 15, p.213-220.

MCCANDLISH, I.A.P. Infecções específicas caninas. In: DUNN, J.K. **Tratado de Medicina de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca Ltda, 1 ed., 2001, p.915-952.

MCCAWE, D. L., THOMPSON, M., TATE, D., BONDERER, A., CHEN, Y. J. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. **Journal of the Veterinary Medical Association**, 1998, v. 213, n. 1, p. 72-75.

MOCHIZUKI, M., HASHIMOTO, M., HAGIWARA, S., et al. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, 1999, v. 37, p. 2936-2942.

OHASHI, K., IWATSUKI, K., NAKAMURA, K., et al. Molecular identification of a recent type of canine distemper virus in Japan by restriction fragment length polymorphism. **Journal Vet. Med. Sci.**, 1998, v. 60, p. 1209-1212.

SWANGO, L.S. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 3 ed., 1992, v.1, p. 312.

ULETT, G.C., KETHEESAN, N., HIRST, R.G. Cytokine gene expression in innately susceptible Balb/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. **Infect Immun**, 2000, v. 68, p. 2034-42.

VANDEVELDE, M. The Pathogenesis of Nervous Distemper. **WSAVA Congress, 29th**, oct. 8-9, Rhodes, Greece, 2004.