



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
BOVINA (BIV) EM REBANHOS BOVINOS DO SUDOESTE DO MARANHÃO**

São Luís - MA

2018

CRISTIAN ALEX AQUINO LIMA

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
BOVINA (BIV) EM REBANHOS BOVINOS DO SUDOESTE DO MARANHÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal CMCA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo

São Luís - MA

2018

CRISTIAN ALEX AQUINO LIMA

**DETECÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
BOVINA (BIV) EM REBANHOS BOVINOS DO SUDOESTE DO MARANHÃO**

Dissertação de Mestrado aprovada em **31 de janeiro de 2018** pela banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo
(Orientador)

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos
(1º membro)

Prof.^a Dra. Nancyleni Pinto Chaves Bezerra
(2º membro)

São Luís - MA
2018

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente”

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida e graças alcançadas. É a Ele que agradeço também por estar aqui hoje, finalizando mais uma etapa da minha vida. Esses anos não foram fáceis, com algumas provas, com a ajuda dele eu pude superar esses obstáculos. Não é, e nunca será fácil nada na vida, mas com a presença de DEUS e com fé Nele, tudo se consegue.

A minha mãe, Maria do Socorro Aquino Lima, pelo amor incondicional e por tudo que faz por mim, por ser minha grande mentora, contribuindo imensamente para minha formação como pessoa e profissional, me apoiando nesse sonho de ser Mestre, fazendo com que eu nunca fraquejasse e continuasse persistente.

Ao meu tio Gilmar por ser a pessoa que sempre esteve ao meu lado, e que apesar da distância, pude ser confiante nos momentos bons e ruins e ele sempre soube acolher e incentivar para concluir essa nova jornada, sabiamente me corrigindo quando eu estava errado.

Ao programa de pós-graduação Mestrado em Ciência Animal – UEMA, Campus São Luís, a coordenadora Prof. Dra. Alana Lislea de Sousa, aos professores por dedicação, competência e ensinamentos transmitidos, e as pessoas que trabalham na coordenação pelo auxílio sempre que solicitado.

A CAPES, pela concessão da Bolsa de Pesquisa.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Ferdinan Almeida Melo, pela grande nobreza em me receber como seu orientado, meu eterno e especial agradecimento por tudo e em especial por obter sua amizade, pessoa a qual me adotou como filho, fazendo com que eu pudesse conhecer e fazer parte da sua família, pessoa incrível que me ajudou muito nesse processo de Pós-Graduação, orientado, ensinando, fazendo com que buscasse cada vez mais conhecimento, mostrando como podemos ser um bom profissional e uma pessoa melhor. Muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, por ter me recebido no Laboratório de Retrovírus da Universidade Federal de Minas Gerais - RetroLab, para que pudesse realizar as análises das amostras. Pelo acolhimento, confiança e ensinamentos. Muito obrigado!

A Ana Karoline Simas e Carla Janaina Rebouças, as quais eu tive a oportunidade de conviver mais nesses últimos dois anos, tornando-se minhas irmãs, sempre me apoiando e incentivando nas atividades do dia a dia e do Laboratório de Imunodiagnóstico da Universidade Estadual do Maranhão - LABIMUNO.

A turma de mestrado MCA2016/2017 a qual tive o privilégio de ter como colegas de turma e hoje como amigos Allana Barros, Ana Karoline Simas, Dgla Dourado, Ester Clevia, Fabiana Borralho, Higor Costa, Ione, Jayanna Maia, Nayara Louzeiro, Paulo Vitor de Carvalho, Samira Brito e Sylvia Zilberberg. Pessoas que tornaram essa jornada mais feliz.

RESUMO

LIMA, C. A. A. **OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA BOVINA EM REBANHOS DO SUDOESTE DO MARANHÃO**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís 2018.

A imunodeficiência viral bovina é uma doença crônica e progressiva que acomete principalmente os bovinos, induzindo sinais de leucocitose persistente, linfadenopatia, emagrecimento progressivo. Podendo estar associada com a diminuição da produção de leite e da resposta linfocitária. Diante disso o objetivo desse trabalho foi verificar a ocorrência do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) no rebanho bovino do Sudoeste maranhense. Para verificar a ocorrência do BIV no rebanho foi feita a detecção do DNA proviral em 550 amostras de sangue bovino oriundos de 31 propriedades, por meio da reação em cadeia da polimerase *Semi nested* (PCR-SN) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a região *pol* do genoma do vírus. Das 550 amostras testadas na PCR-SN para o BIV, 19 (3,4%) foram positivas. As sequências amplificadas foram confirmadas por sequenciamento de nucleotídeos. A similaridade da sequência de nucleotídeos das amostras isoladas com o isolado de Washington foi de 96%. Foram considerados fatores de risco, estatisticamente significativos ($p < 0,05$), associados à disseminação do BIV, na referida região: utilização de leite e derivados para alimentação de outros animais, compra de animais para reprodução e presença de áreas alagadiças na propriedade. Este estudo revela a primeira detecção da presença do BIV no rebanho maranhense, alertando sobre a possibilidade do vírus atuar como fator de risco para a sanidade das populações de bovinas da região.

Palavras chave: Infecção, PCR-SN, Retrovírus, Bovino.

ABSTRACT

LIMA, C. A. A. **OCCURRENCE OF BOVINE IMMUNODEFICIENCY VIRUS IN SOUTHWEST CATTLE OF MARANHÃO**. 2018. Dissertation (Master of Animal Science) – State University of Maranhão, São Luís 2018.

The bovine viral immunodeficiency is a chronic and progressive disease that mainly affects cattle, inducing signs of persistent leukocytosis, lymphadenopathy, progressive weight loss. It may be associated with decreased milk production and lymphocyte response. Therefore, the objective of this study was to verify the occurrence of the Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) in the bovine herd of cattle of the Southwest of Maranhão. In order to verify the occurrence of BIV in the herd of cattle, the proviral DNA was detected in 550 bovine blood samples from 31 properties by means of the *semi-nested* polymerase chain reaction (PCR-SN) using oligonucleotide primers specific for the *pol* region genome of the virus. Of the 550 samples tested on SN-PCR for BIV, 19 (3,4%) were positive. The amplified sequences were confirmed by nucleotide sequencing. The similarity of the nucleotide sequence of the samples isolated with the Washington isolate was 96%. Statistically significant risk factors associated with the dissemination of BIV were considered in this region: use of milk and dairy products to feed other animals, purchase of animals for reproduction and presence of flooded areas on the property. This study reveals the first detection of the presence of BIV in the Maranhão herd of cattle, alerting the possibility of the virus to act as a risk factor for the of the bovine populations of the region.

Keywords: Infection, SN-PCR, Retroviruses, Cattle.

LISTA DE FIGURAS

- 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 (IN), a protease (PR) e transcriptase reversa (RT) e o RNA genômico, que é protegido pelo capsídeo, formando o nucleocapsídeo (NC).....16
- 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 *txr*.....17
- Figura 3.** Mapa dos municípios amostrados da região Sudoeste Maranhense.....25
- Figura 4.** Registro da amplificação do gene GAPDH do DNA extraído da camada leucocitária das amostras de sangue bovino. Eletroforese em 1 %, M: Padrão de peso molecular de 100pb. 1: Controle positivo, 2: Controle negativo, 3-12: amostras positivas para o gene GAPDH.....31
- Figura 5.** Registro da amplificação do gene *pol* por meio da PCR-SN do DNA extraído da camada leucocitária das amostras de sangue bovino. Eletroforese em 1,5 %, M: Padrão de peso molecular de 100pb. 1: Controle positivo, 2: Controle negativo, 9: amostra positiva, 3-8/10-11: amostras negativas.....32
- Figura 6.** Confirmação da sequência proviral do fragmento da região *pol* amplificada a partir da PCR-SN da amostra 2 (Positiva para BIV) com o isolado R-29, apresentando 96% de similaridade, utilizando o software público BLAST.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ocorrência e distribuição mundial do BIV.....	19
Tabela 2. Cidades da Região Sudoeste do Maranhão onde foram realizadas as coletas de amostras, assim como, o número de amostras/propriedades coletadas.....	25
Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores para o gene GAPDH.....	28
Tabela 4. Percentual de animais positivos para BIV da região Sudoeste maranhense.....	32
Tabela 5. Percentual de animais positivos para BIV por cidades da região Sudoeste maranhense.....	33
Tabela 6. Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados ao Vírus da Imunodeficiência bovina no Sudoeste do Maranhão.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida

AIEV - Vírus da anemia infecciosa equina

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

CEAA - Comitê de ética e experimentação animal

DMVP - Departamento de medicina veterinária e preventiva

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP - Desoxirribonucleotídeo fosfatado

ELISA - Ensaio imunoenzimático

Env - Envelope

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

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

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

Vif - Fator de infectividade viral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Histórico	14
2.2 Etiologia e Patogenia	15
2.3 Epidemiologia.....	18
2.4 Sinais Clínicos	20
2.5 Diagnóstico.....	21
2.6 Profilaxia	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Geral	23
3.2 Específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 Área de estudo	24
4.2 Amostras	26
4.3 Extração de DNA.....	26
4.4 Reações em Cadeia da Polimerase	27
4.4.1 PCR para o gene normalizador gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GAPDH..	27
4.4.2 PCR e PCR <i>Semi Nested</i> (PCR-SN) para o BIV	28
4.4.3 Controle Positivo	29
4.4.4 Sequenciamento nucleotídico das amostras <i>pol</i> – BIV	29
4.5 Análise estatística	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, no ano de 2016 possuía aproximadamente 215 milhões de bovinos, o Maranhão com 7,6 milhões, sendo o 2º maior rebanho da Região Nordeste, atuando como um dos esteios para a economia brasileira com altos índices de produção, e comercialização da carne e seus derivados (AGED, 2016; IBGE, 2016).

De acordo com Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão - AGED-MA (2016), a população bovina da região Sudoeste maranhense está estimada em 2,5 milhões de animais.

O Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV) possui um longo período de incubação e a doença não apresenta sinais clínicos evidentes, uma vez infectados os animais estarão atuando como fonte de disseminação da enfermidade no rebanho, acarretando perdas econômicas ao pecuarista pelo fato do agente promover emagrecimento progressivo, queda na produção de leite e tornar o hospedeiro susceptível a infecções oportunistas. O diagnóstico pode ser realizado por meio de técnicas sorológicas e moleculares, sendo a identificação precoce dos animais reagentes no rebanho, segregação ou abate sanitário destes as medidas de controle a serem adotadas, uma vez que não existe vacina disponível no mercado (GONZÁLEZ et al., 2008).

O estudo da detecção molecular do Vírus da Imunodeficiência Bovina no rebanho do Sudoeste maranhense assume grande importância na busca de informações que possam contribuir para a adoção de medidas de controle e redução de prejuízos causados pela doença na referida região, pois, atualmente não existem pesquisas que comprovem a existência desta enfermidade no rebanho bovino maranhense.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

Em 1969 os pesquisadores Cameron Seger e Martin Van der Maater descobriram o vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em uma pesquisa intensiva sobre o agente causador da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), ao realizarem um estudo de campo com um rebanho leiteiro da Estação Experimental do Sudeste da Louisiana em Franklinton, Estados Unidos da América (EUA). Após vários exames, foi observado que estes animais apresentavam leucocitose, condição compatível a um quadro clínico de leucemia bovina. Mas o que lhes chamou a atenção foram as alterações clínicas de linfadenopatia, fraqueza e emagrecimento, apresentadas por uma vaca leiteira da raça holandesa (R-29), com oito anos de idade, prenhe, sugerindo um quadro típico de LEB. Após o nascimento do bezerro, as condições clínicas do animal se agravaram e todas as tentativas para reverter o quadro falharam. O animal veio a óbito e foram realizadas a necropsia e exames histopatológicos dos tecidos coletados, onde se observou infiltrados perivasculares em alguns vasos no cérebro e aumento dos gânglios linfáticos (SUAREZ et al., 1993).

Van der Maaten, em 1972, estudou 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 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, semelhante ao observado no estudo realizado com a R-29 (CORREDOR et al., 2010). Em outro estudo realizado, nenhum bezerro infectado desenvolveu linfossarcoma, descartando qualquer possibilidade do agente causador desta doença ser o vírus da LEB (GONDA et al., 1994). Quando analisado microscopicamente pesquisas revelaram um vírus indutor de sincícios, com semelhanças ao *Lentivírus* ovino, sendo primeiramente denominado como "bovine visna-like virus" (GONDA et al., 1994; VAN DER MAATEN et al., 1972).

Grandes avanços se deram nos estudos do BIV após o isolamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV), na década de 1980, e o elevado número de casos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), houve a necessidade de desenvolvimento de modelos animais para um possível tratamento e controle do HIV na população humana (SU et al., 2010). Com a busca por modelos experimentais associada

a descoberta de que a AIDS era causada por um *Lentivírus*, pesquisadores desenvolveram hipóteses a respeito da relevância deste vírus para a medicina veterinária e humana (MEAS et al., 1998), sugerindo que este poderia ser uma alternativa para contribuir com os avanços das pesquisas com o HIV usando-o como modelo experimental (ST-LOUIS et al., 2004).

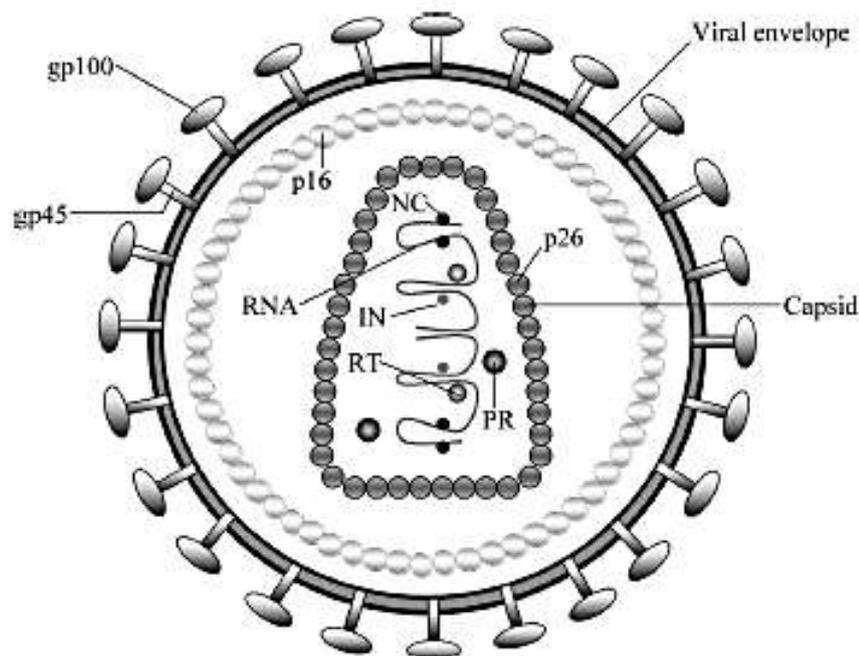
Após serem realizadas análises moleculares e imunológicas de isolados da vaca R-29 foram encontradas semelhanças genética, bioquímica, imunológica, antigênica e estrutural ao HIV tipo 1 (HIV-1) (GONZÁLEZ et al., 2008). Com isso, Gonda (1994) atribuiu uma nova nomenclatura ao vírus, o denominando de vírus semelhante ao da imunodeficiência bovina, conhecido atualmente somente como Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV).

2.2 Etiologia e Patogenia

O BIV pertence à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e gênero *Lentivirus*. A família Retroviridae é composta por uma vasta quantidade de vírus que acometem várias espécies animais (FLORES et al., 2007). Os retrovírus possuem uma estrutura complexa, apresentando um genoma com duas moléculas idênticas de RNA linear de fita simples. São assim denominados por possuírem a enzima transcriptase reversa que, durante o ciclo replicativo tem a capacidade de sintetizar uma molécula de DNA a partir do genoma viral de RNA, processo denominado transcrição reversa (CORREDOR et al., 2010).

Além do BIV, estão incluídos neste gênero os vírus da Anemia Infecciosa Equina (EIAV), Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), Vírus *Maedi-Visna* (MVV) e vírus da doença de Jembrana (JDV) (PATIL et al., 2003). Os lentivírus são exógenos, não oncogênicos, a maioria infecta monócitos e macrófagos, porém o FIV, HIV e SIV atingem os linfócitos T (MOMTAZ et al., 2010), onde podem se replicar em células que não estão em divisão (ST-LOIUS et al., 2004). O genoma dos *Lentivirus* inclui genes acessórios/regulatórios que codificam proteínas, muitas das quais estão envolvidas na regulação da expressão viral (ST- LOUIS et al., 2004).

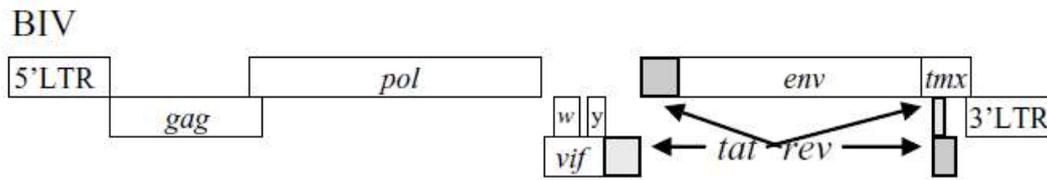
O BIV é um vírus envelopado com aproximadamente 120-130 nm de diâmetros (Figura 1), seu envelope viral apresenta uma bicamada lipídica e é composto pela proteína da superfície viral (SU) gp100 e a proteína transmembrana (TM) gp45 que envolvem o capsídeo viral (CA) cônico, típico dos lentivírus, e as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



Fonte: ST-LOUIS, 2004

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

O BIV apresenta um genoma complexo, com DNA proviral contendo 8960 pb, 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) (CORREDOR et al., 2010; ST-LOUIS et al., 2004).



Fonte: ST-LOUIS, 2004

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/cessórios: *tat*, *rev*, *vif*, e *tmx*.

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).

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).

A infecção pelo BIV ocorre 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).

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

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

2.3 Epidemiologia

Evidências sorológicas sugerem que o BIV esteja distribuído mundialmente (ANDREWS, 2008) e estudos soropidemiológicos e moleculares mostram registros variando de 1,4% a 66% de prevalência de infecções sendo que desde a sua primeira descrição em 1972, esta prevalência tem sido relatada em rebanhos leiteiros e de corte no Canadá (MCNAB et al., 1994), EUA (AMBORSKI et al., 1989;), Brasil (MEAS et al., 2002), Argentina (GONZÁLEZ et al., 2008), Venezuela (WALDER et al., 1995), França (POLACK et al., 1996), Alemanha (MULUNEH, 1994), Itália (CAVIRANI et al., 1998), Suíça e Holanda (HORZINEK et al., 1991), Reino Unido (SCOBIE et al., 2001), Costa Rica (GONDA et al., 1994) (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência e distribuição mundial do Vírus da Imunodeficiência Bovina.

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

A presença da infecção do BIV em rebanhos brasileiros foi relatada pela primeira vez por Meas et al. (2002), avaliando animais provenientes do Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, através da detecção do DNA proviral em leucócitos do sangue periférico, utilizando a técnica de Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) e a detecção de anticorpos contra a proteína p26 do BIV pela técnica de *Western Blot*, com ocorrência de 11,7%, Rodrigues (2014) encontrou uma prevalência de 12,5% ao realizar um estudo no rebanho do estado de Minas Gerais e Albernaz (2015) avaliando o rebanho bubalino da Ilha de Marajó no estado do Pará encontrou 4,4%, ambos utilizando a técnica de PCR.

2.4 Sinais Clínicos

A imunodeficiência viral bovina promove poucos sinais clínicos, até então não tem sido relatado o desenvolvimento de nenhuma doença ou síndrome clinicamente identificável (BHATIA et al., 2013), mas é conhecido que, em animais experimentalmente infectados a doença tem uma progressão semelhante a observada nos casos de HIV em humanos. Os animais desenvolvem uma infecção crônica e permanecem persistentemente infectados pelo resto da vida. Há poucos estudos demonstrando que o BIV seja capaz de, isoladamente, produzir manifestações clínicas e patológicas específicas, geralmente a infecção pode estar associada à outra enfermidade viral, como a LEB, aumentando assim a probabilidade do aparecimento de sinais clínicos (ANDREWS, 2008). Nos achados de necropsia e histopatológico encontra-se aumento de linfonodos, emaciação e infiltrados linfocitários perivasculares no cérebro (TERZIEVA, 2008).

O BIV promove uma depleção das células do sistema imunológico, deixando o animal vulnerável, aumentando a susceptibilidade a infecções secundárias (BRUJENI et al., 2010).

Ao realizar estudos com bovinos experimentalmente infectados foi identificado um quadro de linfocitose, hiperplasia linfoide, alguns animais apresentaram claudicação e andar rígido, mostrando que o vírus pode comprometer o sistema locomotor. Foi relatado ainda sinais nervosos, como alterações comportamentais, irritação e comportamento agressivo (BRUJENI et al., 2010). Em outro experimento foram

constatados animais com sinais de sonolência, letargia, ataxia, tendência ao decúbito e prolapso de terceira pálpebra (ANDREWS, 2008).

Sugere-se que haja uma relação entre o estresse de manejo sofrido pelo animal de acordo com o sistema de produção adotado na unidade produtora de bovinos e a infecção viral pelo BIV. Sob condições experimentais, os animais não manifestam totalmente a sintomatologia da doença, o animal vem a desenvolver o quadro clínico após a aplicação de um manejo de forma correta, promovendo ou evitando o estresse do animal (CARTER, 2008). Contudo, a susceptibilidade à infecção pelo BIV pode depender da estirpe do vírus, das raças bovinas e de fatores ambientais (MOANNA, 2005).

2.5 Diagnóstico

Até o presente momento, para o diagnóstico do BIV, não há uma técnica preconizada como um teste “padrão ouro” (BHATIA et al., 2013). Este pode ser realizado por meio da detecção sorológica e também por técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFA) (DAFFNER E SCORTTI, 1997), ensaios imunoenzimáticos como o *Western Blot* (ANDREWS, 2008) e o ELISA (GONZÁLEZ et al., 2008). Além de técnicas de detecção direta, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e transcrição reversa de PCR (RT-PCR) (RAVAZZOLO E COSTA, 2007).

O isolamento viral é considerado o exame laboratorial "padrão ouro" para o diagnóstico de vários patógenos virais (BHATIA et al, 2013), no entanto o BIV não é facilmente isolado principalmente em animais naturalmente infectados, devido a esta dificuldade, atualmente só existem quatro isolamentos realizados com sucesso. O primeiro isolamento relatado foi a partir de uma vaca com linfocitose persistente, o isolado americano R-29 (VAN DER MAATEN et al.,1972). Os outros três foram o BIVCR1, isolado na Costa Rica (HIDALGO et al., 1995) e os FL491 e FL112, ambos isolados na Flórida (SUAREZ et al., 1993).

Até o momento, não há tratamento disponível para a infecção pelo BIV, sendo recomendado o tratamento das infecções secundárias. Em rebanhos com manejos inadequados (nutricional, reprodutivo e sanitário), os animais podem manifestar os sinais clínicos da doença. Entretanto, em rebanhos com manejo adequado, os sinais clínicos podem ser minimizados ou inaparentes (ANDREWS, 2008).

2.6 Profilaxia

As medidas de controle da infecção pelo BIV consistem na identificação precoce da doença no rebanho e segregação dos animais acometidos, uma vez que não existem vacinas comerciais disponíveis no país. Sendo que a realização de um bom manejo sanitário pode evitar transmissão iatrogênica e contribui para manter o plantel livre da doença (LEITE, 2013).

A presença do agente etiológico no Brasil pode ser considerada como um fator de risco para a saúde do rebanho, e um potencial agente causador de doença crônica em bovinos, podendo levar a uma perda econômica significativa para o pecuarista brasileiro (LEITE, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Detectar do Vírus da Imunodeficiência Bovina (BIV) pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.2 Específicos

- Identificar através do sequenciamento genético qual estirpe do vírus da imunodeficiência bovina está presente no rebanho bovino do Sudoeste maranhense.
- Identificar os principais fatores de risco associados a disseminação e circulação do BIV em diferentes propriedades rurais do Sudoeste maranhense.
- Contribuir com a defesa sanitária do Estado do Maranhão com informações sobre o BIV no rebanho bovino do Sudoeste maranhense.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

A região Sudoeste do Estado do Maranhão, que está localizada à margem de uma das mais importantes vias fluviais do Centro Oeste e Meio Norte, o Rio Tocantins, entre as coordenadas geográficas, na latitude de 5°31'33''Sul e na longitude de 47°28'33''Oeste (Figura 3). Altitude de 95 metros, em média, em uma área de transição entre o cerrado e a Floresta Amazônica. Território razoavelmente plano e fértil, com uma vegetação bastante explorada, sendo que atualmente apresenta cobertura vegetal, consideravelmente modificada devido a diversas ações antrópicas (MAPSAT, 2012).

O clima na região é equatorial quente úmido, por estar situado em uma área de transição da Amazônia Legal, com características de altos índices pluviométricos, com média de 1500 a 2500 mm anuais e temperaturas muito elevadas, com médias entre 25°C a 27°C praticamente o ano inteiro. A transição de cerrado apresenta um clima tropical com características semelhantes da Região Amazônica, com duas estações bem definidas, verão ou estação seca, nos meses de maio a setembro e inverno ou estação chuvosa, nos meses de outubro a abril. Segundo o último censo realizado, a área total da região Sudoeste maranhense é de 27.157,30 km² (EMPLASA, 2010).

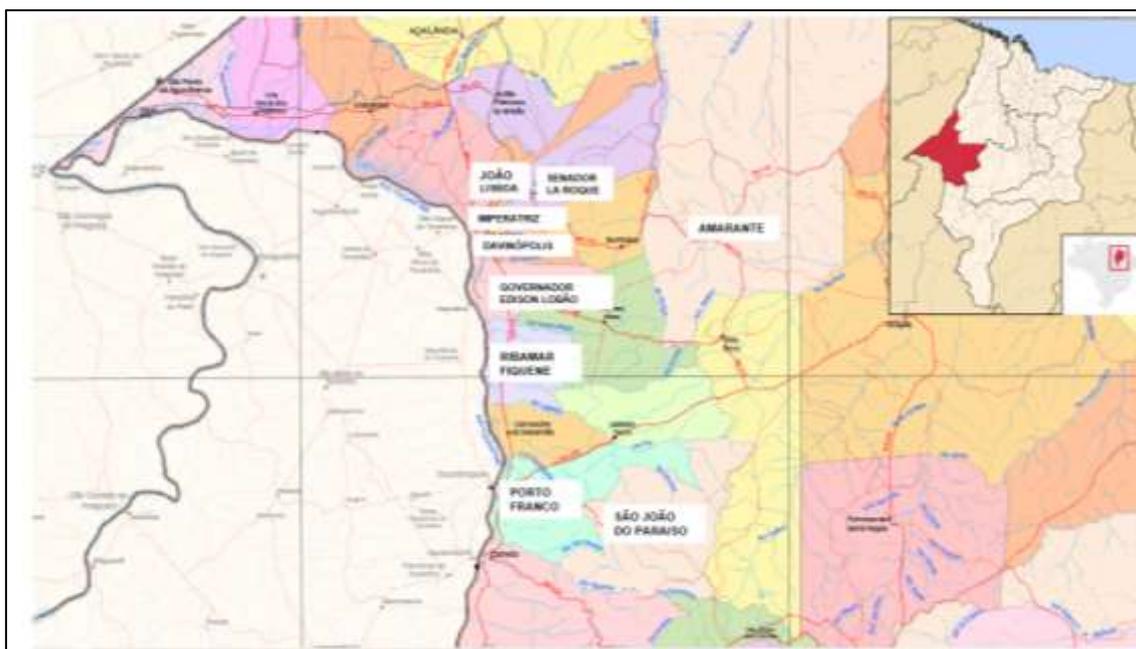
Segundo a Agência Estadual de Defesa Agropecuária do Maranhão (AGED, 2016), o estado faz parte do Circuito Pecuário Nordeste, está classificado como Zona Livre de Febre Aftosa com vacinação. Possui o segundo rebanho bovino do Nordeste, com 7.576.806 bovinos, sendo detentor do 12º rebanho bovino do país. Na região Sudoeste maranhense encontra-se a maior bacia leiteira do estado, com uma população bovina estimada em 155.633 animais divididos em 670 propriedades tendo em média de produção mensal de 1.870.500 litros de leite.

O estudo foi realizado em 31 propriedades localizadas na zona rural dos municípios da região Sudoeste do Maranhão: Imperatriz, Davinópolis, Ribamar Fiquene, Porto Franco, Governador Edson Lobão, Amarante, Senador La Roque, João Lisboa e São João do Paraíso (Tabela 2).

Tabela 2. Quantidade de propriedades amostradas e número de amostras coletadas em cidades da Região Sudoeste do Maranhão.

Cidades	Propriedades Amostradas	Nº de Amostras Coletadas
Imperatriz	4	65
João Lisboa	3	60
São João do Paraíso	3	45
Amarante	2	50
Davinópolis	4	70
Governador Edson Lobão	3	60
Ribamar Fiquene	4	65
Porto Franco	4	70
Senador la Roque	4	65
Total	31	550

Figura 3. Cidades integrantes da região Sudoeste maranhense.



Fonte: Adaptado do IBGE, 2015

4.2 Amostras

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CEEAA/UEMA), processo N° 44/2017.

O tamanho da amostra foi determinado por meio da fórmula do Centro Pan-Americano de Zoonoses (1997), para o estudo de enfermidades crônicas, em que

$$N = \frac{p \cdot (100 - p) \cdot Z^2}{\left(\frac{d \cdot p}{100}\right)^2}$$
 sendo N= número de amostras; p= prevalência esperada; Z= grau de

confiança e d= margem de erro, com nível de confiança de 95% e erro amostral de 5%. Como a prevalência estimada não é conhecida utilizou-se no cálculo a prevalência esperada de 50% com o objetivo de maximizar o tamanho da amostra, totalizando 550 amostras a serem coletadas.

Foram coletadas de cada animal uma amostra de 10 mL de sangue por punção da veia jugular, utilizando-se sistema à vácuo (*Vacutainer*®) estéril, em tubos contendo anticoagulante ácido amino tetra-acético (EDTA). Foram centrifugadas a 1610 g por 10 minutos para separação da camada leucocitária (*buffy coat*). Em seguida a camada leucocitária foi retirada e transferida para tubos de polietileno sendo armazenados à temperatura de -20° C para posterior realização das técnicas de biologia molecular.

De forma simultânea, a coleta de amostras de sangue bovino foi aplicado um questionário epidemiológico (Anexo 2), em todas as propriedades, para avaliar os fatores de risco de disseminação da doença.

4.3 Extração de DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico total da camada leucocitária foi extraído utilizando-se o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Este kit destinou-se à extração de DNA total de amostras de sangue. O protocolo de extração de DNA através deste kit está descrito no Anexo 1.

4.4 Reações em Cadeia da Polimerase

4.4.1 PCR para o gene normalizador gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase GAPDH

Foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do gene GAPDH bovino, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores segundo Pinheiro de Oliveira et al. (2013).

Os iniciadores estão apresentados na Tabela 3. 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) chegando a um volume final de 25 µL.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores para o gene 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-se em uma desnaturação inicial de 95°C por quatro 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 de gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (1,0 mg/µL), em tampão TAE (Tris Acetato EDTA) pH 8,3. O DNA foi aplicado no gel e submetido à eletroforese a uma voltagem constante de 100V e corrente de 400 mA por 40 minutos.

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).

4.4.2 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 (5' AGCCACCCAGACATCATGTT 3') 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 *Semi Nested* 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. Foram utilizados dois µL do produto amplificado na primeira reação (PCR) 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), 0,5µL de dNTP *mix* (10mM – Promega, EUA) 1,5µL de MgCl₂ (10mM – Promega, EUA), 0,1µL de *Go Taq Flexi DNA Polymerase* (500U – Promega, EUA) e água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen-Life Technologies®, EUA) para o volume final de 25µL.

A reação foi conduzida em termociclador modelo *Veriti™ 384 well* (Applied Biosystems, EUA) com desnaturação inicial de 94°C 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 avaliados em gel de agarose. Os produtos da reação foram avaliados em gel de agarose, conforme descrito no item 4.3.1.

4.4.3 Controle Positivo

O controle positivo utilizado para a PCR-SN de identificação do BIV nas amostras testadas, foi originado do Laboratório de Retrovíroses da Universidade Federal de Minas Gerais, gentilmente cedido pela pesquisadora MSc. Ana Paula Rodrigues.

4.3.4 Sequenciamento nucleotídico das amostras *pol* – BIV

Para confirmar a especificidade da PCR e PCR-SN para a amplificação do BIV foi realizada uma a 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 BIV *SNested*) e água ultrapura livre de DNase e RNase para o volume final de 7,5 µL. As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho modelo ABI3730 *Genetic Analyser*, utilizando-se polímero POP7 com a utilização do reagente *BigDye v3.1* (Applied Biosystems, EUA).

4.5 Análise estatística

Os dados foram processados e analisados utilizando-se o programa GraphPad Prism 7.0.4, sendo utilizado na análise univariada o teste exato de Fisher. A estimativa do risco foi dada pelo cálculo da razão de chances ou *odds ratio* (OR), com intervalo de confiança de 95%. Em todos os testes fixou-se em 5% o nível de significância. Realizou-se análise multivariada para os fatores de risco por meio do teste de regressão logística, para se evitar os confundimentos e para determinar os OR ajustados daquelas variáveis que demonstraram ter associação estatisticamente significativa na análise univariada.

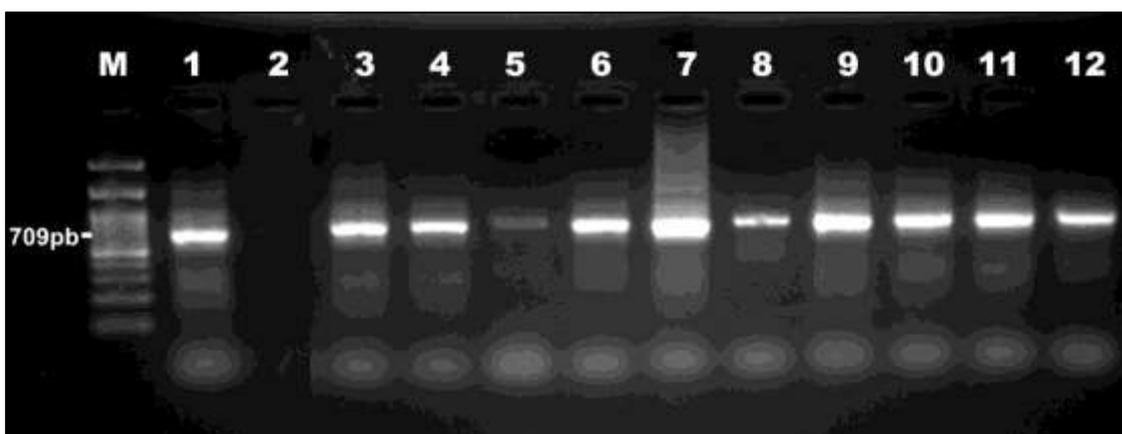
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa pesquisa, trata-se do primeiro relato da infecção em bovinos no estado do Maranhão e na Região Nordeste do Brasil, pelo vírus da imunodeficiência bovina (BIV). A presença da infecção do BIV em rebanhos brasileiros foi relatada pela primeira vez por Meas et al. (2002), avaliando animais provenientes do Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, com ocorrência de 11,7%, Rodrigues (2014) encontrou uma prevalência de 12,5% no rebanho do estado de Minas Gerais e Albernaz (2015) avaliando o rebanho bubalino da Ilha de Marajó no estado do Pará encontrou 4,4%.

Com a finalidade de avaliar a eficácia da extração de DNA, todo o material genético extraído da camada leucocitária do sangue de bovinos foi submetido a uma PCR convencional para a detecção do gene GAPDH.

A amplificação desse gene foi avaliada em gel de agarose submetido a eletroforese, resultando em um fragmento de 709 pb (Figura 4), de acordo com a metodologia descrita por Pinheiro de Oliveira et. al (2013).

Figura 4. Registro da amplificação do gene GAPDH do DNA extraído da camada leucocitária das amostras de sangue bovino. Eletroforese em 1 %, M: Padrão de peso molecular de 100pb. 1: Controle positivo, 2: Controle negativo, 3-12: amostras positivas para o gene GAPDH.



Fonte: o autor

A detecção do gene GAPDH foi positiva em 550 (98,1%) das 560 amostras testadas até o presente momento. Este percentual de amplificação indica que a extração de DNA obteve êxito, o qual aumentou a confiabilidade dos testes, diminuindo assim, a

possibilidade de resultados falsos negativos, pela inexistência ou degradação do DNA das amostras analisadas.

Por meio da técnica PCR-SN detectou-se que 19 (3,4%) (Tabela 4) amostras foram positivas para o BIV as quais amplificaram o fragmento alvo de tamanho 154 pb (Figura 5) do total de 550 amostras analisadas. Em nosso estudo encontrou-se menor ocorrência percentual do BIV em relação aos percentuais encontrados em rebanhos bovinos por Meas et al. (2002) 11,7%, Rodrigues (2014) 12,5% nos estados de Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, Minas Gerais respectivamente.

Tabela 4. Percentual de animais positivos para BIV da região Sudoeste maranhense.

Microrregião	Nº Propriedades	Nº de Amostras	Nº de Animais positivos para BIV	% de animais positivos para BIV
Sudoeste Maranhense	31	550	19	3,4%

Já foi detectado o BIV em rebanhos bubalinos no Paquistão por Meas et al. (2000a), no Cambodja por Meas et al. (2000b) e mais atual no Brasil, na Ilha do Marajó por Albernaz et al. (2015) com valores de ocorrência de 10,3%, 16,7% e 4,4%, respectivamente.

Figura 5. Registro da amplificação do gene *pol* por meio da PCR-SN do DNA extraído da camada leucocitária das amostras de sangue bovino. Eletroforese em 1,5 %, M: Padrão de peso molecular de 100pb. 1: Controle positivo, 2: Controle negativo, 9: amostra positiva, 3-8/10-11: amostras negativas.



Fonte: o autor

Jacobs et al. (1998) citam a existência de uma discordância entre as formas de detecção sorológica e a molecular do BIV. Em sua grande maioria, os estudos relacionados com a ocorrência desse vírus são realizados, por meio de técnicas sorológicas. Contudo, após a implementação e padronização dos testes moleculares, houve uma maior acurácia e segurança nos resultados (TAJBAKHSI et al., 2010). González et al. (2000) fornecem evidências de que os resultados da PCR apresentam uma confiabilidade maior que outros métodos diagnósticos.

Ao analisar o percentual de infecção pelo BIV nos municípios estudados (Tabela 5), observou-se que o rebanho pertencente a cidade de Imperatriz (9,2%) apresentou o maior número de animais positivos. Isso pode ser explicado pelo fato de se tratarem de unidades produtoras de leite, onde os animais permanecem estabulados para ordenha e fornecimento de alimentação, havendo um contato maior entre os mesmos, aumentando a probabilidade de troca de fluídos e secreções corpóreas. Contribuindo, assim, para disseminação horizontal da doença, uma vez que Desrosiers (2007) evidenciou em suas pesquisas, que essas excreções atuam como forma de transmissão ativa do vírus.

Tabela 5. Percentual de animais positivos para BIV por cidades da região Sudoeste maranhense.

Cidades	Propriedades	Nº de Amostras	Nº de Animais positivos para BIV	% de animais positivos para BIV
Imperatriz	4	65	6	9,2%
João Lisboa	3	60	2	3,3%
São João do Paraíso	3	45	4	8,9%
Amarante	2	50	0	0,0%
Davinópolis	4	70	3	4,3%
Governador Edson				
Lobão	3	60	2	3,3%
Ribamar Fiquene	4	65	2	3,1%
Porto Franco	4	70	2	2,9%
Senador la Roque	4	65	0	0,0%

As regiões gênicas comumente utilizadas para a detecção do BIV são a *env* e *pol* (MOMTAZ et al., 2010), contudo foi utilizada nesse estudo apenas a região *pol*, pelo fato desta região ser considerada a mais conservada entre os *Lentivírus* (MEAS et al., 1998).

A técnica molecular tem se tornado uma ferramenta importante na detecção direta de patógenos, por apresentar alta especificidade e sensibilidade ao detectar uma quantidade relativamente pequena de DNA (TAKIUCHI et al., 2003). Haja vista a

ausência de um teste simples e eficaz, uma vez que o DNA proviral do BIV pode ser detectado em animais soronegativos, sendo que estes podem assumir um papel importante na disseminação da doença.

Os resultados do fragmento *pol* do BIV foram analisados utilizando o programa BIOEDIT versão 7.1.9 e submetidos a busca por similaridade por meio do *software* público BLAST (NCBI). As sequências obtidas em nosso estudo confirmam a similaridade de 96% com o isolado R-29 depositado no *Genbank* (Figura 6).



(Adaptado do software público BLAST)

Figura 6. Confirmação da sequência proviral do fragmento da região *pol* amplificada a partir da PCR-SN da amostra 2 (Positiva para BIV) com o isolado R-29, apresentando 96% de similaridade, utilizando o software público BLAST.

A detecção do BIV no estado do Maranhão encontrada, mesmo em percentual menor, em relação aos demais estudos realizados no Brasil, contribui para o avanço do diagnóstico da circulação de novos agentes infecciosos presentes nos rebanhos do estado, que podem estar influenciando diretamente na diminuição da produção animal na região estudada, associado a outros patógenos de frequência epidemiológica já diagnosticadas.

O uso de técnicas diagnósticas moleculares mais sensíveis, tornam-se imprescindíveis, para contribuição do controle das enfermidades infectocontagiosas nos rebanhos.

A análise univariada obteve resultados estatisticamente significativos para as variáveis: utiliza leite e derivados para alimentação de outros animais ($P= 0,0011$), compra de animais para reprodução ($P= 0,0008$), existência de áreas alagadiças ($P= 0,0459$) e existência de piquete maternidade ($P=0,00008$) (Tabela 6). Levando em consideração que as propriedades estudadas encontram-se em uma área de fronteira do Estado do Maranhão com os estados do Pará e Tocantins, havendo um comércio constante de animais na região, a variável compra de animais para reprodução mostra-se como fator de risco para disseminação da enfermidade no rebanho, uma vez que pode-se estar introduzindo animais infectados oriundos de estados com diagnóstico positivo para o BIV.

Tabela 6. Análise univariada dos possíveis fatores de risco associados ao Vírus da Imunodeficiência bovina no Sudoeste do Maranhão.

Variáveis	Positivo		Negativo		Total		OR	IC 95%	P	
	N	%	N	%	N	%				
Tipo de exploração	Leite	2	0,36	150	27,27	152	27,64	0,28	0,06-1,19	0,1173
	Mista	17	3,09	381	69,27	398	72,36			
Tipo de ordenha	Manual	13	3,07	411	96,93	424	74,40	0,63	0,25-1,65	0,4036
	Mecânica	6	4,76	120	95,24	126	22,60			
Utiliza leite e derivados para alimentar outros animais	SIM	10	9,26	98	90,74	108	18,46	4,90	1,09-11,79	0,0011*
	NÃO	9	2,04	433	97,96	442	81,54			
Realiza testes diagnóstico brucelose e tuberculose	SIM	7	2,71	251	97,29	258	47,27	0,65	0,25-1,58	0,4844
	NÃO	12	4,11	280	95,89	292	52,73			
Compra animais para reprodução	SIM	17	5,90	271	94,10	288	51,04	8,15	2,04-35,8	0,0008*
	NÃO	2	0,76	260	99,24	262	48,96			
Aluguel de pastos	SIM	4	4,40	87	95,60	91	37,66	0,44	0,15-1,29	0,2146
	NÃO	15	9,43	444	90,57	459	62,34			
Existem áreas alagadiças	SIM	9	2,37	370	97,63	379	69,68	0,39	0,16-0,99	0,0459*
	NÃO	10	5,85	161	94,15	171	30,32			
Possui piquete maternidade	SIM	5	1,41	350	98,59	355	65,91	0,18	0,07-0,48	0,00008*
	NÃO	14	7,18	181	92,82	195	34,09			
Tem assistência veterinária	SIM	10	2,70	360	97,30	370	67,80	0,52	0,20-1,28	0,2123
	NÃO	9	5,0	171	95,0	180	32,20			

OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança

$P < 0,05$ – estatisticamente significativo; $p > 0,05$ – não estatisticamente significativo

A variável utilização de leite e derivados para alimentação de outros animais também foi considerada fator de risco, uma vez que o BIV pode ser transmitido pelo colostro ou no útero por via transplacentária e por meio da troca de fluidos corporais e sangue, de acordo com os trabalhos realizados por Moody et al. (2002).

As variáveis existência de áreas alagadiças e piquete maternidade foram consideradas fator de proteção, não há relatos, até o presente momento, na literatura que demonstrem a influência das mesmas no surgimento da infecção pelo BIV. Entretanto Moody et al. (2002) descreveram as diversas formas de infecção do BIV, vertical e horizontalmente, ressaltando a troca de fluidos uterinos.

Mais estudos devem ser realizados à cerca da infecção e transmissão via láctea do BIV, haja vista que está pode ser uma das formas de disseminação da enfermidade em um rebanho leiteiro.

6 CONCLUSÕES

De acordo com estudo realizado, podemos concluir que:

- Das 31 propriedades, dos nove municípios testados, 7 (sete) municípios apresentaram animais positivos na PCR-SN para BIV, onde cada município tornou-se um foco.
- Foi identificada uma ocorrência percentual de 3,4%, confirmando a circulação do vírus no estado. Dado este que servirá de alerta aos produtores e agências de defesa animal.
- Os principais fatores de risco encontrados nesse estudo relacionados a infecção pelo BIV foram a utilização de leite e derivados para alimentação de outros animais, compra de animais para reprodução, existência de áreas alagadiças e piquete maternidade apresentaram-se como fator de proteção.
- Faz-se necessário a realização de parcerias junto à agência de defesa sanitária do estado, com finalidade de expandir os estudos para as demais regiões maranhenses, com propósito de diagnóstico, prevenção e controle do BIV no estado.

REFERÊNCIAS

- AGED. Relatório de vacinação do banho leiteiro da Regional de Imperatriz. 2016, 1p.
- ALBERNAZ, T.T.; LEITE, R.C.; REIS, J.K.P. et al. Molecular detection of bovine immunodeficiency vírus in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon region, Brazil. **Tropical Animal Health Production**. V. 47, p. 1625-1628, 2015.
- ALKHATIB, G.; COMBADIÈRE, C.; BRODER C.C. 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.; LO, 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.; BLOWEY, R. W.; BLOYD, 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.; POLACK, B.; SCHWARTZ-CORNIL, I. et al. Bovine immunodeficiency virus: facts and questions. **Veterinary Reserch**, 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.
- BRUJENI, M.J.; POORBAZARGANI T.T.; NADIN-DAVIS S. 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.
- CARTER, C.A.; EHRLICH, L.S. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 425-443, 2008.
- CAVIRANI, S.; DONOFRIO, G.; CHIOCCO, D. 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.
- 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.

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. **Journal of Veterinary Medicine.**, v. 29, n. 1, p.5-11, 1997.

DESROSIERS, R.C. Nonhuman Lentiviruses. In: D.M.H.P.M. KINIPE, **Fields Virology**, 5th ed. [S.I.]: Lippincott Williams and Wilkins. P. 2216-2243, 2007.

EMPLASA. Lei Complementar Estadual do Maranhão nº 89, de 17 de novembro de 2005. Disponível em <<http://www.emplasa.sp.gov.br/fnem/arquivos/Legisla%C3%A7%C3%A3o%20Regi%C3%B5es%20Metropolitanas/Maranhao/LC%2089%20RM%20SUDOESTE%20MARANHENSE.pdf>>. Acesso: 25/03/2016.

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

GENG, Y.; KASHANCHI, F.; WOOD, C. A. Activation of bovine immunodeficiency-like virus expression by bovine herpesvirus type 1. **Virology**, v. 187, p. 832-836, 1992.

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

GONZÁLEZ, G.C.; JOHNSTON, J.B.; NICKEL, D.D. et al. Very low prevalence of bovine immunodeficiency virus in western Canadian cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 65, p. 73-76, 2000.

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

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.

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

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

- JACOBS, R.M.; JEFFERSON, B.J.; SUAREZ, D.L. Prevalence of bovine immunodeficiency virus in bulls as determined by serology and proviral detection. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 231-233, 1998.
- LEITE, R.C; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, A.P. et al. Retrovíroses dos animais domésticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 73-92, 2013.
- 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.
- MAPSAT – Tecnologia em Geoprocessamento. Disponível em: <www.mapsat.com.br> Acesso em 22/03/2016.
- MEAS, S.; KABEYA, H., YOSHIHARA, S. et al. Seroprevalence and Field Isolation of Bovine Immunodeficiency Virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, p. 1195-1202, 1998.
- MEAS, S.; SUGIMOTO, C.; BAKHSH, 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.; OHASH, K.; TUM, 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.; RUAS, J.F.; USUI, T. 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.
- MOODY, C. A.; PHARR, G. T.; MURPHEY, J. et al. Confirmation of vertical transmission of bovine immunodeficiency virus in naturally infected dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 113-119, 2002.
- MOMTAZ, H.; TAJBAKSH, E.; MOMENI, M. Cloning and phylogenetic analysis of bovine immunodeficiency virus *env* gene in Iranian isolates. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, p. 492- 496, 2010.
- 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.
- NCBI.NCBI BLAST. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: 25/09/2017.
- 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.

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

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

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

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. *Retroviridae*. In: FLORES, E. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007. Cap. 31, p. 808-837.

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.; VENABLES, C.; SAYERS, A. R.; WEIGHTMAN, S. et al. Prevalence of bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Great Britain. **Veterinary Record**, v. 149, p. 459-460, 2001.

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

SNIDER, T.G.; HOYT, P.G.; LUTHER, G.D. 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-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.

SUAREZ, D. L.; VAN DER MAATEN, M, J.; WOOD, C. et al. Isolation and Characterization of new wild-type isolates of bovine lentivirus. **Journal of Virology**, v. 67, n. 8, p. 5051-5055, 1993.

SU, Y; QIAO, W.; GOU, T. et al. Microtubule-dependent retrograde transport of bovine immunodeficiency virus. **Celular Microbiology**, v. 12, p. 1098-1107, 2010.

TAJBAKHS, E.; BORUJENI, G.; MOMTAZ, H. et al. Molecular prevalence for bovine immunodeficiency virus infection in Iranian cattle population. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, n. 12, p. 1199-1202, 2010.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, F. et al. Standardization of a polymerase chain reaction (Semi Nested-PCR) to detect bovine herpesvirus type 1 in aborted fetus and semen from naturally infected cattle. **Semina: ciencias agrarias**, v. 24, n. 1, p. 43-56, 2003.

TERZIEVA, V.; REGULATORY, T. Cells and HIV-1 infection. **Viral Immunology**, v.21, p. 285-291, 2008.

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.; KALVATCHEV, Z.; TOBIN, G. L. 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.

WRIGHT, S.M.; MLECZKO, A.; COATS, K.S. Bovine immunodeficiency virus expression *in vitro* is reduced in the presence of beta-chemokines, MIP-1 alpha, MIP-1 beta and Rantes. **Veterinary Research Communications**, v. 26, p. 239-250, 2002.

WU, L.; PAXTON, W.A.; KASSAM, N. et al. CCR5 levels and expression. Pattern correlate with infectability by macrophagetropic HIV-1, *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, p. 1681-1691, 1997.

ANEXO

