

PEDRO AUGUSTO ALVES

**PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DIAGNÓSTICO PARA
ESTOMATITE VESICULAR POR PCR EM TEMPO
REAL**

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Co-orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte, Dezembro de 2010

PEDRO AUGUSTO ALVES

**PADRONIZAÇÃO DE UM TESTE DIAGNÓSTICO PARA
ESTOMATITE VESICULAR POR PCR EM TEMPO
REAL**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Co-orientadora: Profa. Dra. Erna Geessien Kroon

Belo Horizonte, Dezembro de 2010

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPEMIG, além do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia do ICB/UFMG, que através do seu corpo docente, discente e demais funcionários, possibilitaram a realização do meu trabalho de forma prazerosa e gratificante.

À minha orientadora Dra. Giliane de Souza Trindade, pela cumplicidade, companheirismo, confiança e sabedoria durante todos esses anos, possibilitando a realização do meu trabalho com muita vontade e dedicação. Obrigado por ter me guiado nessa caminhada.

À minha co-orientadora Dra. Erna Geessien Kroon, pela oportunidade de participar de um grupo tão importante e especial, que é o Laboratório de Vírus. Completo uma das etapas mais importantes da minha vida, graças ao seu esforço em me fazer participar disso.

Aos demais professores do Laboratório de Vírus, que também fizeram parte disso, através de um grupo coeso, que ao longo de muitos anos, mantem uma estrutura de infinitas possibilidades no âmbito da virologia.

Aos meus tantos colegas de laboratório, que possibilitaram uma convivência excepcional, com amizade, companheirismo, solidariedade e muita ciência.

Aos meus pais, Fausto e Rosa e aos meus irmãos, Cleber e Maria Tereza, que sempre depositaram total confiança em mim desde o início. A vitória é de todos nós.

A todos os meus familiares, que caminharam junto comigo nessa batalha.

A Deus, pela força que me foi dada durante todo esse caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	i
RESUMO	6
ABSTRACT	7
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
1.1. Família Rhabdoviridae	8
1.1.1. Classificação	8
1.1.2. Morfologia.....	8
1.1.3. Estrutura do Genoma.....	9
1.1.4. Ciclo de multiplicação dos Rabdovírus.....	10
1.1.5. Partículas Defectivas	13
1.2. Gênero Vesiculovirus	14
1.2.1. O Vírus da Estomatite Vesicular (VSV)	14
1.3. A Estomatite Vesicular.....	15
1.3.1. Histórico e Distribuição Geográfica.....	17
1.3.2. Epidemiologia	19
1.3.3. Diagnóstico	21
1.3.4. Tratamento, controle e prevenção	24
II. JUSTIFICATIVA.....	26
III. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos Específicos.....	28
IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO	29
V. MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1. Células Vero.....	30
5.2. Vírus	30
5.2.1. Origem.....	30
5.2.2. Titulação do vírus.....	31
5.2.2.1. Titulação viral por contagem de UFP.....	31
5.2.2.2. Ensaio de formação de cometas	31
5.2.3. Multiplicação viral	31
5.3. Extração de RNA viral	32

5.4. Produção de cDNA.....	32
5.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional	32
5.5.1. Extração de DNA do gel	34
5.6. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T.....	34
5.7. Transformação Bacteriana (SAMBROOK et al, 1989).....	35
5.8. Triagem das colônias.....	35
5.9. Obtenção de DNA plasmidial em pequena escala.....	36
5.10. Sequenciamento	36
5.11. Análise das sequências	37
5.11.1. Montagem e edição das sequências nucleotídicas.....	37
5.11.2. Busca de similaridade em bancos de dados.....	37
5.11.3. Alinhamento das sequências	37
5.12. qPCR	37
5.12.1. Desenho dos iniciadores.....	37
5.12.2. Gradiente de temperatura para os iniciadores VSV RT F e VSV RT R.....	38
5.12.3. Teste do qPCR com os iniciadores VSV RT F e VSV RT R – mix caseiro.....	39
5.12.4. Teste de sensibilidade utilizando mix comercial.....	40
5.12.5. Preparação de um pré-mix caseiro	40
5.12.6. Padronização – Curva de iniciadores	41
5.12.7. Padronização – Curva de MgCl ₂	42
5.12.8. Padronização – Curva de dNTP	43
5.12.9. Teste de sensibilidade utilizando mix caseiro	43
5.12.10. Teste de especificidade da reação	44
5.12.11. Teste de sensibilidade.....	45
5.12.12. Extração de RNA com TRIZOL®	46
5.12.13. Tratamento com DNase.....	46
5.12.14. Teste da RT	47
5.12.15. Curva de iniciadores utilizando amostra clínica.....	48
5.12.16. Comparação entre amostras tratadas e não tratadas com DNase	49
5.12.17. qPCR das amostras clínicas.....	50
5.12.18. Genes de referência	50
5.12.18.1. β-Actina.....	50
5.12.18.2. HPRT.....	51
VI. RESULTADOS.....	52

6.1. Passagem, multiplicação e titulação do VSV em monocamada de células Vero	52
6.2. Ensaio de formação de cometas	53
6.3. Extração de RNA viral	54
6.4. Produção de cDNA, PCR convencional e extração de DNA do gel	54
6.5. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T, transformação bacteriana e triagem das colônias	55
6.6. Obtenção de DNA plasmidial em pequena escala.....	56
6.7. Sequenciamento e análise das sequências	56
6.8. qPCR	57
6.8.1. Iniciadores	57
6.8.1.1. Gradiente de temperatura para os iniciadores VSV RT F e VSV RT R.....	59
6.8.1.2. Teste da qPCR com os iniciadores VSV RT F e VSV RT R – mix caseiro.....	60
6.8.2. Teste de sensibilidade utilizando mix comercial.....	61
6.9. Padronização do qPCR.....	62
6.9.1. Preparação de um pré-mix caseiro	62
6.9.2. Padronização – Curva de iniciadores	64
6.9.3. Padronização – Curva de MgCl ₂	66
6.9.4. Padronização – Curva de dNTP	68
6.9.5. Teste de sensibilidade utilizando mix caseiro	70
6.9.6. Teste de especificidade da reação	71
6.10. Teste da RT	72
6.11. Curva de iniciadores utilizando amostra clínica.....	74
6.12. Comparação entre amostras tratadas e não tratadas com DNase	76
6.13. qPCR das amostras clínicas.....	78
6.14. Genes de referência	79
6.14.1. β-Actina.....	79
6.14.2. HPRT.....	81
VII. DISCUSSÃO	82
VIII. CONCLUSÕES.....	90
IX. PERSPECTIVAS	91
X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – micrograma

µL - microlitro

A – Adenina

aa - aminoácido

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATP - Adenosina trifosfato

C – Citosina

C(+) – controle positivo

cDNA – DNA complementar

CI – Controle interno

CMC - carboximetilcelulose

CN – controle negativo

CO₂ – Dióxido de Carbono

COCV – *Cocal virus*

Ct – *Cycle threshold*

dATP – desoxiadenina fosfatada

dCTP – desoxicitosina fosfatada

dGTP – desoxiguanina fosfatada

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – desoxirribonucleotídeos fosfatados

DTT – Dithiothreitol

dTTP – desoxitimina fosfatada

ECP – Efeito citopático

EDTA – ácido etilendiaminotetracético

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA – Estados Unidos da América

F – *forward*

fg - fentograma

g – grama

G – Guanina

h – hora

H₂O - água

HCl – ácido clorídrico

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

kb - quilobases
KCl – Cloreto de potássio
LB – meio de Luria-Bertani
M – Molar
M.O.I – multiplicidade de infecção
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM – Meio mínimo essencial de Eagle
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
min – minuto
mL – mililitro
mM – milimolar
M-MLV – *Moloney Murine Leukemia Virus*
Na₂HPO₄ – hidrogenofosfato de sódio
NaCl – cloreto de Sódio
NaHCO₃ – bicarbonato de sódio
ng – nanograma
nm – nanômetro
nM – nanomolar
nt – nucleotídeo
°C – graus Celsius
OIE - *World Organisation for Animal Health*
OMS – Organização Mundial de Saúde
p/v – peso/volume
PANAFTOSA – Centro Pan-Americano de Febre Aftosa
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
pH – potencial hidrogeniônico
qPCR – PCR quantitativa
R – reverso
R² – coeficiente de linearidade
RABV - *Rabies virus*
RNA – Ácido ribonucléico
RNAm – RNA mensageiro
rpm – rotações por minuto
RT – transcrição reversa
s - segundo

SFB – soro fetal bovino

T – Timina

TAE – Tris-acetato-EDTA

T_m – temperatura de dissociação

U - Unidades

U/μL – unidades/microlitro

U/mL – unidades/mililitro

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

V – Volt

VSAV – *Vesicular stomatitis Alagoas virus*

VSIV – *Vesicular stomatitis Indiana virus*

VSNJV – *Vesicular stomatitis New Jersey virus*

VSV – vírus da estomatite vesicular

pg – picograma

pmol/μL – picomol/microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Surtos de estomatite vesicular ocorridos nos EUA entre 2004 – 2006	19
Tabela 2: Relação dos iniciadores a serem utilizados na amplificação do gene L do VSV	33
Tabela 3: Relação de iniciadores utilizados no teste de RT	47
Tabela 4: Relação dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para o VSV	58
Tabela 5: Relação dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para a β -actina bovina	80
Tabela 6: Relação dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para a HPRT bovina	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia e estrutura dos rabdovírus.....	9
Figura 2. Representação esquemática da estrutura do genoma de um VSV.	10
Figura 3. Diagrama do ciclo de multiplicação dos rabdovírus.....	11
Figura 4. Diagrama da atividade da polimerase dos rabdovírus	12
Figura 5. Sinais clínicos de estomatite vesicular.....	16
Figura 6. Esquema dos iniciadores utilizados para amplificar o gene da Polimerase viral.....	38
Figura 7. Efeito citopático de VSV em monocamada de células Vero.	52
Figura 8. Placas de titulação do VSV 9.28 coradas com cristal violeta.	53
Figura 9. Placas com resultado do ensaio de formação de cometas.	53
Figura 10. Gel de poliacrilamida a 8% corado com prata.	55
Figura 11. Resultado da triagem das colônias em gel de poliacrilamida a 8%	56
Figura 12. Alinhamento da sequência obtida.	57
Figura 13. Alinhamento de parte das sequências do VSIV, VSAV e COCV	57
Figura 14. Resultado do teste de gradiente de temperatura em gel de poliacrilamida a 8%	59
Figura 15. Resultado do teste da qPCR com os iniciadores VSV RT F e VSV RT R.	60
Figura 16. Resultado do teste de sensibilidade utilizando mix comercial.....	61
Figura 17. Resultado do teste do pré-mix caseiro.	63
Figura 18. Resultado da curva de concentração de iniciadores.....	65
Figura 19. Resultado da curva de concentração de MgCl ₂	67
Figura 20. Quadro com os resultados da curva de concentração de MgCl ₂	67
Figura 21. Resultado da curva de concentração de dNTP.....	69
Figura 22. Resultado do teste de sensibilidade utilizando mix caseiro.	70
Figura 23. Resultado do teste de especificidade com amostras virais relacionadas.....	71
Figura 24. Resultado do teste de especificidade com uma amostra de <i>S. aureus</i>	72
Figura 25. Resultado dos testes da RT.	73
Figura 26. Resultado da otimização da concentração de iniciadores.	75
Figura 27. Resultado do teste de tratamento com DNase I.	77
Figura 28. Resultado da qPCR das amostras clínicas.	78
Figura 29. Desenho dos iniciadores de β -actina bovina.....	80

RESUMO

A estomatite vesicular foi primeiramente descrita nos Estados Unidos em 1926 como uma doença vesicular de equinos e, subsequentemente de bovinos e suínos. A doença se caracteriza pela formação de vesículas principalmente na língua, lábios, mucosa oral, tetas e na banda coronária das patas desses animais. O vírus da estomatite vesicular, agente causador da doença, é um vírus de RNA senso negativo e envelopado que pertence ao gênero *Vesiculovirus*, da família *Rhabdoviridae*. A estomatite vesicular é clinicamente indistinguível de outras doenças vesiculares, como a febre aftosa, o exantema vesicular dos suínos e a doença vesicular dos suínos, quando equinos não estão envolvidos. Isso traz grandes implicações sócio-econômicas e, na falta de um diagnóstico clínico, o diagnóstico laboratorial torna-se urgente e imprescindível em caso de suspeita de estomatite vesicular. Neste trabalho, o material genético de uma amostra protótipo de VSV foi utilizado como molde em PCR convencional para obtenção de um plasmídeo controle positivo da reação. A amostra protótipo foi caracterizada a partir do sequenciamento do plasmídeo com o inserto de VSV. Para a qPCR, foram desenhados os iniciadores, em uma região conservada do gene *L* (RNA polimerase viral), a partir de sequências da amostra protótipo (VSIV) e de amostras de campo (VSAV e COCV). A padronização da reação com plasmídeo controle foi feita com mix caseiro, sendo que a concentração final de cada iniciador foi de 1,25 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$, com 10 μM de dNTP e 2,0 mM de MgCl_2 . Os corantes utilizados foram o EvagreenTM para o sistema de detecção e o ROX[®] como referência passiva. A reação foi otimizada para aumentar a sensibilidade e os parâmetros finais foram os seguintes: 4,0 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$ de cada iniciador, 100 μM de dNTP e 2,0 mM de MgCl_2 . Foram escolhidos os genes de β -actina e HPRT bovinos para serem utilizados como normalizadores da reação. O teste apresentou resultados satisfatórios quando utilizado o mix comercial, mas com necessidade de aprimoramentos principalmente com relação aos iniciadores para ser utilizado no diagnóstico da estomatite vesicular bovina.

Palavras chave: estomatite vesicular; vírus da estomatite vesicular; PCR em tempo real.

ABSTRACT

Vesicular stomatitis was first described in the United States in 1926 as a vesicular disease of horses, and subsequently of cattle and swine. The disease is characterized primarily by formation of vesicles on the tongue, lips, oral mucosa, teats and the coronary band of the animal's feet. The vesicular stomatitis virus (VSV), the disease causative agent, it's an enveloped negative strand RNA virus that belongs to *Vesiculovirus* genus, family *Rhabdoviridae*. Vesicular stomatitis is clinically indistinguishable from other vesicular diseases, like foot and mouth disease, swine vesicular exanthema and swine vesicular disease, when equines are not involved. This brings great socio-economic implications and in the absence of a clinical diagnosis, laboratory diagnosis becomes urgent and indispensable in case of suspicion of vesicular stomatitis. In this work, the genetic material of a VSV reference sample was used as template in conventional PCR to obtain a plasmid positive control of the reaction. The reference sample was characterized from the plasmid sequencing with VSV insert. For qPCR, primers were designed in a conserved region of the *L* gene (viral RNA polymerase), from the reference strain (VSIV) sequences and field samples (VSAV and COCV). The standardization of reaction with plasmid control was made with homemade mix, and the final concentration of each primer was 1,25 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$, with 10 μM of dNTP and 2,0 mM of MgCl_2 . The dyes used were Evagreen™ for detection system and ROX® as passive reference. The reaction was optimized to increase the sensitivity and the final parameters were as follows: 4,0 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$ of each primer, 100 μM of dNTP and 2,0 mM of MgCl_2 . Genes of β -actin and HPRT were chosen to be used as internal controls of reaction. The assay presented satisfactory results when using the commercial mix, but in need of improvements especially regard with primers for use in the diagnosis of bovine vesicular stomatitis.

Keywords: vesicular stomatitis; vesicular stomatitis virus; real time PCR.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Família *Rhabdoviridae*

1.1.1. Classificação

A família *Rhabdoviridae* consiste em mais de 185 diferentes vírus isolados de plantas e animais. São vírus envelopados, com nucleocapsídeos helicoidais e que possuem um genoma de RNA fita simples, senso negativo, que compartilham entre si uma forma alongada ou de projétil. Essa morfologia distinta separa os rabdovírus dos outros táxons na ordem *Mononegavirales*, que inclui também as famílias *Bornaviridae*, *Filoviridae* e *Paramyxoviridae*, que infectam vertebrados. Entretanto, os rabdovírus possuem um amplo espectro de hospedeiros, podendo se multiplicar em plantas, em vertebrados ou em invertebrados. A família *Rhabdoviridae* possui muitos patógenos de importância médica, veterinária e botânica. Os rabdovírus que infectam animais estão compreendidos em quatro gêneros: *Lyssavirus*, *Vesiculovirus*, *Ephemerovirus* e *Novirhabdovirus* (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

Os rabdovírus compartilham várias características morfológicas e funcionais com os membros da ordem *Mononegavirales*. Os vírus dessa ordem formam grandes estruturas, sofrem maturação durante o brotamento, apresentam espículas glicoprotéicas que se ligam às membranas e o nucleocapsídeo possui a forma helicoidal. Possuem genoma de RNA fita simples, não segmentado, com polaridade negativa e um arranjo similar de genes (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

1.1.2. Morfologia

Os vírus são envelopados, em forma de vara ou cone (Figura 1), com aproximadamente 45 a 100nm de diâmetro e 100 a 430nm de comprimento. Normalmente, os rabdovírus de animais possuem 180nm de comprimento e 80nm de largura, enquanto que os de plantas podem ser maiores. O tamanho da partícula é definido pelo tamanho do RNA genômico, fazendo com que a incorporação de genes adicionais no genoma viral resulte, conseqüentemente, em partículas maiores (CURETON, 2010).

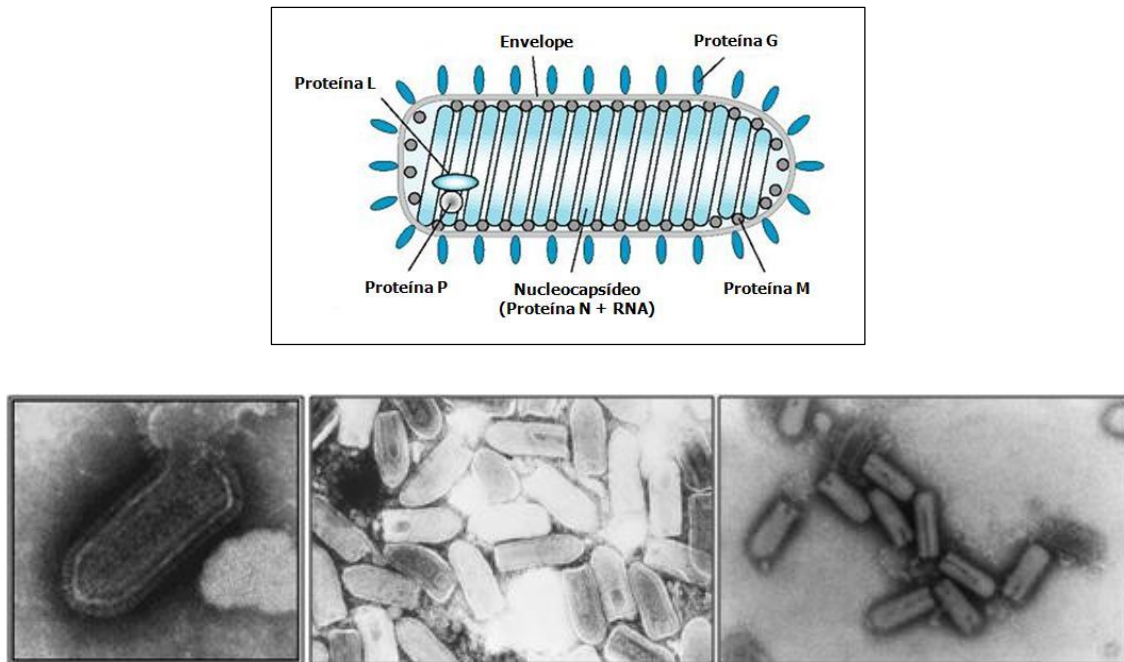


Figura 1. Morfologia e estrutura dos rhabdovírus. (A) Representação esquemática de um rhabdovírus. (B) Eletromicrografia em contraste negativo de VSV. Fontes: LYLES & RUPPRECHT, 2007 - modificado; www.medgadget.com; www.dost-dongnai.gov.vn.

Os vírus maduros se apresentam sob a forma de projétil, em que uma extremidade é arredondada e a outra é plana, ou baciliforme, em que as duas extremidades são arredondadas. O genoma de RNA do vírus da estomatite vesicular (VSV), com 11 a 12kb, é encapsidado por aproximadamente 1200 cópias de uma única nucleoproteína principal (proteína N), sendo que cada molécula de proteína N interage com nove bases. O nucleocapsídeo está associado a uma fosfoproteína (proteína P) e a uma polimerase (proteína L), que são responsáveis pela atividade de RNA polimerase associada ao vírus. O nucleocapsídeo também está associado à proteína de matriz (proteína M), que é responsável pela forma de projétil adquirida pelo vírus. O envelope apresenta uma glicoproteína viral (proteína G) que se associa em trímeros e está relacionada com os processos de adsorção e penetração (ROCHE, 2008).

1.1.3. Estrutura do Genoma

O genoma dos rhabdovírus é constituído de RNA fita simples, não segmentado e de polaridade negativa (Figura 2), não possui cap 5' nem cauda 3' poli A, sendo incapaz de atuar como um RNA mensageiro. O genoma dos vesiculovírus é o menor dentre os vírus da família *Rhabdoviridae*, o que é consistente com o seu papel de protótipo dos vírus de RNA de fita negativa. Sequências com, aproximadamente 50 nt nas

terminações 3' e 5' do genoma (sequência *leader* e *trailer*, respectivamente) são parcialmente complementares. Elas contêm sequências atuantes em *cis* que servem como promotores da transcrição e replicação e como sinais de encapsidação do genoma e antígenoma durante a replicação (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

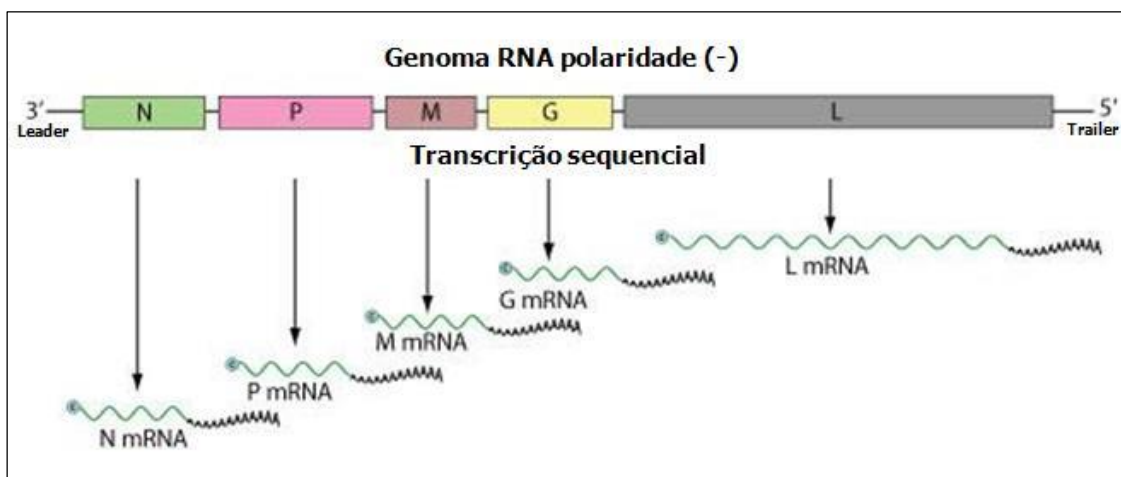


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do genoma de um VSV. Fonte: adaptado de www.expasy.org.

O genoma dos vesiculovírus codifica cinco proteínas (3'-N-P/C-M-G-L-5'), semelhante aos outros vírus de RNA fita negativa e não segmentados. Cada junção de genes possui uma sequência conservada que especifica o final do gene anterior, uma sequência intergênica e uma sequência que especifica o início do próximo gene. Essas regiões não traduzidas são pequenas (10 a 50 nt) e controlam a atividade da RNA polimerase viral (RAHMEH, 2010).

1.1.4. Ciclo de multiplicação dos Rabdovírus

O ciclo de multiplicação dos rabdovírus é típico da maioria dos vírus de RNA fita negativa e não segmentados (FIGURA 3). Para o mecanismo de adsorção, uma variedade de receptores é utilizada em diferentes células hospedeiras. Apesar de ainda não se conhecer receptores para VSV, estudos demonstram a participação de algumas moléculas na adsorção do RABV, como o receptor nicotínico de acetilcolina (LENTZ *et al.*, 1982), a molécula de adesão de célula neural (CD56) (THOULOUBE *et al.*, 1998) e o receptor do fator de crescimento neural de baixa afinidade p75^{NTR} (TUFFEREAU *et al.*, 1998). Estudos demonstraram a participação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas não específicas como mediadores da adsorção do VSV às células hospedeiras. Uma característica interessante é que a adsorção do RABV e do VSV é

tanto mais eficiente quanto mais ácido for o pH, na faixa entre 6.5 a 5.6 (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

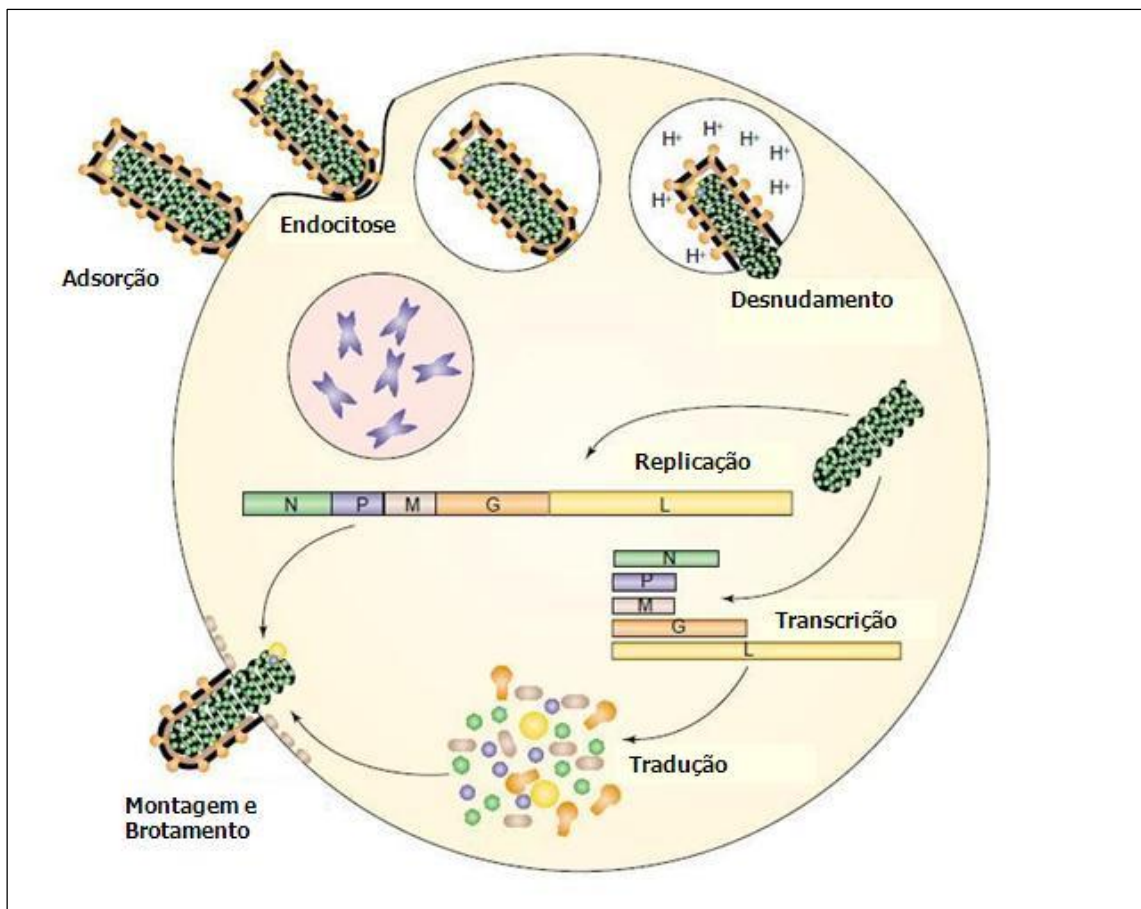


Figura 3. Diagrama do ciclo de multiplicação dos rabdovírus. Fonte: LICHTY, 2004 – modificado.

O VSV penetra na célula pela via endocítica dependente de clatrina. Ao longo da via, as vesículas perdem a cobertura de clatrina e se tornam endossomos precoces que, posteriormente, passam a endossomos tardios e lisossomos. As partículas virais presentes nas vesículas são expostas a um pH progressivamente mais ácido, por causa da bomba de prótons ATP-dependente presente na membrana das mesmas. Em um pH em torno de 6.5 a proteína G medeia a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, promovendo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Entretanto, foi demonstrado que, muitas vezes, o evento de fusão ocorre na membrana de corpos multivesiculares, que são vesículas formadas pela invaginação da membrana dos endossomos. Nesse caso, a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma depende da fusão do corpo multivesicular com a membrana do endossomo (*back fusion*), o que representa um processo relativamente ineficiente, já que, muitas vezes, o processo ocorre tardiamente e o material pode ser degradado por proteases e outras enzimas. Portanto, é

provável que a eficiência de alguns tipos celulares em realizar esses processos possa influenciar na eficiência de infecção por esses vírus (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

Após a liberação dos componentes virais no citoplasma, a proteína M se dissocia do nucleocapsídeo, uma etapa necessária para a ocorrência da síntese de RNA viral, já que a proteína M inibe este processo. Nenhuma etapa adicional de desnudamento é necessária, tendo em vista que o RNA encapsidado serve de molde para o complexo viral de transcrição (CURETON, 2010).

O VSV possui um mecanismo de transcrição sequencial, em que sinais atuantes em *cis* no molde de RNA controlam a atividade do complexo transcricional em cada junção de gene (FIGURA 4). Com exceção da junção entre a sequência líder e o gene N, cada uma das junções contém uma sequência finalizadora do gene transcrito (3'AUACUUUUUUU5'), um dinucleotídeo intergênico (G/CA), que não é transcrito, e uma sequência iniciadora do próximo gene (3'UUGUC5') (ROSE, 1980). Essas sequências também funcionam como sinais para poliadenilação e terminação do mRNA transcrito, para iniciação, adição do cap5' e metilação do próximo mRNA. O encapsidamento do RNA pela proteína N durante a síntese parece ser um sinal para que a RNA polimerase viral ignore as sequências das junções e possa produzir um RNA completo (antigenoma), que vai servir de molde para a replicação do genoma (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

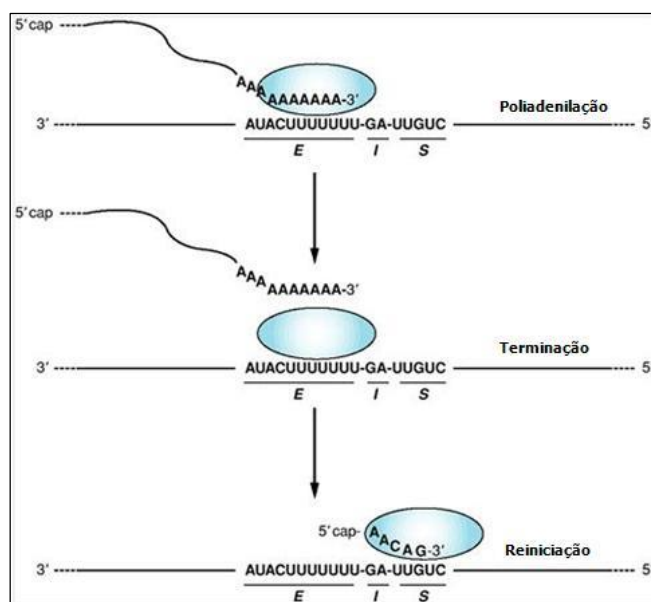


Figura 4. Diagrama da atividade da polimerase dos rabdovírus durante a transcrição em resposta à sequência finalizadora (E), ao dinucleotídeo intergênico (I) e à sequência iniciadora (S) no molde de RNA genômico. Fonte: LYLES & RUPPRECHT, 2007 - modificado.

A maioria dos nucleocapsídeos contendo genomas virais de VSV produzida durante o ciclo de multiplicação permanece associada às células infectadas e não é liberada na forma de progênie viral, sugerindo que o uso de nucleocapsídeos como molde predomina sobre o uso na montagem das partículas (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

Como para a maioria dos vírus, os componentes individuais dos rabdovírus são produzidos em compartimentos celulares separados e somente se juntam nas etapas finais da montagem viral. O nucleocapsídeo é formado durante o processo de replicação do RNA, enquanto que a proteína G é sintetizada em associação com o retículo endoplasmático e segue para o Complexo de Golgi através de vesículas. Após sofrer modificações pós-transcricionais, como glicosilação (READING *et al.*, 1978), formação de trímeros e palmitoilação (SCHMIDT & SCHLESINGER, 1979), a proteína G segue a via secretória até atingir a membrana plasmática. A proteína M é sintetizada como uma proteína solúvel e se associa à membrana plasmática da célula hospedeira (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

Após a formação dos complexos de nucleocapsídeo-proteína M, a etapa final consiste na liberação da progênie viral. O processo parece ser mediado pela interação entre a proteína M e proteínas do hospedeiro envolvidas na formação dos corpos multivesiculares. Ainda não se sabe quais fatores celulares envolvidos na formação dos corpos multivesiculares estariam envolvidos na liberação das partículas virais (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

1.1.5. Partículas Defectivas

As partículas defectivas de VSV são rapidamente geradas durante a multiplicação do vírus em cultura de células. Isso ocorre quando a RNA polimerase viral, durante a replicação do RNA, muda o molde de uma região, utilizando a mesma fita ou fitas diferentes. Os genomas resultantes são defectivos, fazendo com que as partículas defectivas possam se replicar apenas em células coinfetadas com o vírus selvagem, que produz a fonte de proteínas virais (CURETON, 2010).

As mudanças na atividade da polimerase podem gerar genomas com grandes deleções internas (COLONNO *et al.*, 1977) ou, em outros casos, genomas que apresentam mais de um promotor. Em ambos os casos, os genomas defectivos levam vantagem de replicação em comparação com o genoma normal, por causa do menor tamanho ou por

apresentar mais de um promotor, o que resulta em uma diminuição substancial do título viral. Além da rápida multiplicação, os genomas defectivos necessitam das proteínas produzidas pela infecção por vírus selvagens para montagem das partículas, o que explica a grande perda de título viral. Tendo em vista a importância desse processo, para evitar o acúmulo de partículas defectivas, a passagem em cultura de células deve ser feita utilizando o vírus em baixa multiplicidade de infecção (CURETON, 2010).

1.2. Gênero *Vesiculovirus*

Os membros do gênero *Vesiculovirus* foram alocados em um único sorogrupo de VSV, baseando-se em padrões de reatividade cruzada nos testes de imunofluorescência e fixação do complemento, enquanto que as análises de sequência demonstraram similaridades. Altas homologias são observadas entre os genes *N* em comparação com os genes *G*. O sorogrupo de VSV supracitado inclui o *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV) (protótipo do gênero), *Vesicular stomatitis New Jersey virus* (VSNJV), *Vesicular stomatitis Alagoas virus* (VSAV), e outros como, *Carajas virus* (CJSV), *Chandipura virus* (CHPV), *Cocal virus* (COCV), *Isfahan virus* (ISFV), *Maraba virus* (MARAV) e *Piry virus* (PIRYV) (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2010).

1.2.1. O Vírus da Estomatite Vesicular (VSV)

O vírus da estomatite vesicular pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Vesiculovirus* (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2010). Estão incluídos na grande ordem *Mononegavirales*, cujos vírus possuem RNA de fita simples e polaridade negativa, o que impede a sua tradução direta em proteínas. Portanto, esses vírus possuem sua própria RNA polimerase para fazer a replicação e a transcrição do seu genoma, com consequente produção de mRNA (LYLES & RUPPRECHT, 2007).

Existem dois grupos imunologicamente distintos do VSV que foram identificados: New Jersey (NJ) e Indiana (IND). Esses vírus têm sido extensivamente estudados em nível molecular, principalmente para o desenvolvimento de vetores recombinantes para vacinas e para o tratamento de câncer (GAO *et al.*, 2009; BAREFOOT *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2008). De acordo com a classificação baseada em relações sorológicas, existem três subtipos virais no sorogrupo IND: IND-1, IND-2 e IND-3, e são conhecidos como

Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV), *Cocal virus* (COCV) e *Vesicular stomatitis Alagoas virus* (VSAV), respectivamente (FEDERER *et al.*, 1967). Amostras do sorotipo NJ e subtipo IND-1 são endêmicas em bovinos nas áreas do sul do México, América Central, Venezuela, Colômbia, Equador e Peru, com o VSV-NJ sendo o responsável pela maioria (>80%) dos casos clínicos. Foi relatada a identificação esporádica de VSV-NJ e IND-1 no norte do México e no oeste dos EUA. O IND-2 foi isolado na Argentina e no Brasil somente de equinos (Salto-Argentina/63, Maipú-Argentina/86, Rancharia-Brasil/66, Ribeirão-Brasil/79), visto que o rebanho bovino presente junto aos equinos afetados e descritos nesse estudo não desenvolveu anticorpos contra o VSV (ALONSO *et al.*, 1985). O subtipo IND-3 (Alagoas-Brasil/64) foi identificado esporadicamente apenas no Brasil e somente em equinos até 1977. Entretanto, em 1977 o subtipo IND-3 (Espinosa-Brasil/77) foi primeiramente isolado de gado bovino no Brasil. Todavia, esse subtipo afeta o gado em menor grau em comparação com equinos (ALONSO *et al.*, 1985). Esse achado confirma as primeiras descrições, em 1926 e 1927 (OLTSKY *et al.*, 1926; COTTON, 1927), de VSV NJ e IND em equinos e, subsequentemente, em bovinos e suínos. A mesma correlação tem sido observada em outros surtos de estomatite vesicular (OIE, 2008).

O VSV é o vírus envelopado protótipo em estudos de penetração, multiplicação e montagem de partículas virais, devido ao seu amplo espectro de hospedeiros e um ciclo de multiplicação simples, que pode ser estudado em uma grande variedade de células de mamíferos e de insetos (WHITT, 2010). Essas características referentes ao ciclo de multiplicação levaram-no a ser muito utilizado em estudos de terapia antitumoral, como vírus recombinantes oncolíticos (MILLER, SAMUEL, WONGTHIDA, 2010).

1.3. A Estomatite Vesicular

A estomatite vesicular foi descrita nos Estados Unidos em 1926 (OLTSKY *et al.*, 1926) como uma doença vesicular de equinos e, subsequentemente, de bovinos e suínos. Ovinos, caprinos e mamíferos silvestres também podem se infectar (OIE, 2008). Com menor frequência pode acometer o homem causando sintomas semelhantes à gripe, mas existem relatos da forma cutânea da enfermidade na faringe, mucosa bucal, língua e na pele, em decorrência da inoculação direta do vírus acidentalmente em laboratório ou durante a realização de necropsia de animais infectados (HANSON, 1981; BISHOP, 1979).

As vesículas causadas pelo vírus são localizadas principalmente na língua, lábios, mucosa oral, tetas e na banda coronária das patas de bovinos, equinos, suínos e de muitas outras espécies de animais domésticos e selvagens. Normalmente as vesículas aparecem em um só tecido susceptível não ocorrendo generalização (BISHOP, 1979). A doença natural em carneiros e cabras é rara, embora ambas as espécies possam ser experimentalmente infectadas. Infecções mistas de febre aftosa e estomatite vesicular têm ocorrido em rebanhos bovinos e podem ser induzidas experimentalmente. Muitas espécies de animais de laboratório também são susceptíveis (OIE, 2008).

As vesículas que ocorrem na boca, lábios e gengivas causam uma salivação excessiva, o que dificulta a alimentação (FIGURA 5). O animal perde peso, pois não se alimenta adequadamente e reluta em andar devido às dores provocadas pelas lesões na banda coronária das patas. Uma mastite grave pode ocorrer em virtude das vesículas nas tetas dificultando a amamentação dos bezerros, que podem se infectar por essa via (BISHOP, 1979; MASS, 2009). Todos esses sintomas estão relacionados às perdas econômicas principalmente na produção de carne e leite.



Figura 5. Sinais clínicos de estomatite vesicular. (A) Vesículas na língua de um bovino infectado com VSV. (B) Vesícula rompida na região da boca de um bovino infectado com VSV. (C) Salivação excessiva de um bovino infectado com VSV, um dos sinais que aparecem no início do quadro infeccioso. Fonte: adaptado de www.vetmed.ucdavis.edu

O período de incubação da enfermidade varia de 3 a 14 dias e o animal se convalesce em um período de 2 a 3 semanas (BURTON, 1917). A infecção subclínica pode ocorrer tanto em animais quanto em humanos que tiveram contato com o vírus, uma vez que podem não desenvolver a doença, mas apresentam níveis elevados de anticorpos no soro (BISHOP, 1979).

A incidência da doença pode variar muito entre os rebanhos afetados. Normalmente, 10 a 15% dos animais apresentam sinais clínicos. Os casos clínicos ocorrem principalmente em animais adultos, visto que bovinos e equinos de até um ano de idade raramente são afetados (BRANDLY *et al.*, 1951). A mortalidade é próxima de zero em ambas as espécies, entretanto, foi observada uma alta taxa de mortalidade em suínos afetados pelo vírus NJ. As implicações econômicas mais importantes envolvem a perda da produção leiteira dos rebanhos, queda do preço da carne no mercado, trabalho adicional durante o surto, custos associados à imposição de quarentena, e suspensão da comercialização internacional de carne, como aconteceu com o estado de Goiás em junho de 2008 (HAYEK *et al.*, 1998; IBGE, 2008). Ambos os subtipos NJ e IND-1 nos surtos dos EUA em 1995, 1997 e 1998 causaram doenças clínicas primariamente em equinos. Embora alguns sinais clínicos tenham sido observados no gado, os primeiros achados nesses animais foram a soroconversão (OIE, 2008).

1.3.1. Histórico e Distribuição Geográfica

A estomatite vesicular foi primeiramente relatada nos EUA em 1916 em um evento que atingiu proporções epidêmicas em bovinos e equinos (TEIDEBOLD *et al.*, 1916). Entretanto, uma doença clinicamente similar foi descrita em cavalos em 1862, durante a guerra civil dos EUA (McCLELLAN *et al.*, 1864). Em 1915, durante a 1ª Guerra Mundial, veterinários franceses descreveram uma doença clinicamente semelhante à estomatite vesicular em cavalos importados dos EUA e do Canadá para a Europa (HANSON, 1952; BISHOP, 1979). Existem relatos da doença na África do Sul, em cavalos, que datam do século XIX (1884 e 1887). Após esse episódio, não houve mais notificações de estomatite vesicular nesta localidade ou em nenhuma outra parte da África (HANSON, 1952).

Em 1925, bovinos transportados de Kansas City – Missouri para Richmond – Indiana, desenvolveram lesões vesiculares na boca e iniciaram um surto de estomatite vesicular na região. A etiologia viral da doença foi estabelecida por Cotton em 1927 (COTTON, 1927) e a amostra foi denominada de VSV–Indiana (VSV-I). Em 1926, outro surto atingiu o gado na região de New Jersey. O vírus causador da doença era antigenicamente diferente da amostra VSV–I e atualmente é conhecida como a amostra VSV–New Jersey (VSV-NJ) (COTTON, 1926 e 1927). Os vírus VSV-I e VSV-NJ representam os dois sorotipos mais comumente isolados nas Américas. O último surto

de VSV-I relatado nos EUA ocorreu em 1965 (WEBB *et al.*, 1989). O sorotipo VSV-NJ foi o responsável pelos surtos nos EUA em 1944, 1949, 1957, 1959, 1963, 1982-1983, 1985 e 1995 (BRIDGES *et al.*, 1997).

Em 1961 foram descritas amostras sorologicamente distintas dos dois tipos clássicos: VSV-I e VSV-NJ. A amostra do vírus Indiana-2 Cocal foi isolada de pulgas que se alimentavam de ratos de arrozais na floresta de Trinidad (América Central). De 1966 a 1968 o vírus Indiana-2 foi diagnosticado no Brasil, no município de Rancharia (São Paulo) onde se isolou o vírus Indiana-2 Rancharia (Indiana-2 Rancharia – Brasil/66). Esse vírus está relacionado ao vírus Indiana-2 Salto (Argentina/63) (PUSTIGLIONE NETTO *et al.*, 1969). Novas epidemias do vírus Indiana-2 ocorreram em 1978 no Rio Grande do Sul e em 1979 no município de São José de Boa Vista (São Paulo) onde foi isolado um vírus também relacionado ao vírus Indiana-2 Salto. Esse vírus foi denominado de Indiana-2 Ribeirão – Brasil/79. Em 1998, novos focos ocorreram em Santa Catarina e Paraná (LOPES, 1999).

Em 1964, ocorreu um surto em mulas, em várias regiões do estado de Alagoas (Brasil) e no estado vizinho de Pernambuco (ANDRADE *et al.*, 1979). O vírus isolado era sorologicamente distinto dos VSV conhecidos, como o VSV-I e Cocal, e foi denominado Indiana-3 Alagoas (Indiana-3 Alagoas – Brasil/64). No estado de Minas Gerais, o primeiro isolamento ocorreu em 1977 no município de Espinosa, de uma amostra semelhante ao vírus Indiana-3 Alagoas, sendo denominada Indiana-3 Espinosa (Indiana-3 Espinosa – Brasil/77).

Atualmente, o VSV é endêmico em muitos países da América Latina e é responsável por perdas econômicas importantes na indústria pecuária. A doença causada pelos sorotipos VSV-NJ e VSV-I foi relatada em 11 países da América Latina em 1996 (OIE, 1996). Dentre os VSV descritos, somente os sorotipos Indiana-2 e Indiana-3 apresentam importância epidemiológica no Brasil (LÓPEZ *et al.*, 1996-1997), tendo em vista a ausência de relatos de ocorrência do sorotipo VSV-NJ. Isso é corroborado pelo fato de que o VSV-NJ é característico de regiões de clima temperado (RODRÍGUEZ, 1996).

As relações entre as amostras de VSV-I foram estudadas por FEDERER e colaboradores (1967). Foi proposta a seguinte classificação: Indiana-1 para a amostra clássica isolada nos EUA; Indiana-2 para as amostras Cocal (Trinidad) e Salto (Argentina); e Indiana-3 para a amostra Alagoas. Portanto, o sorotipo VSV-NJ não

possui subtipos e a sua distribuição é ampla nas áreas temperadas da América do Norte, enquanto que o sorotipo VSV-I possui três subtipos, dos quais dois estão limitados à América do Sul (MASON, 1978). Uma nova classificação tem sido proposta, em que os subtipos Cocal e Alagoas seriam classificados como espécies (ICTV, 2009).

Atualmente a doença apresenta atividade endêmica do norte da América do Sul (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) ao norte do México e sudeste dos Estados Unidos. Atividade epidêmica geralmente ocorre no sul da América do Sul, Estados Unidos e Canadá (RODRIGUEZ *et al.*, 1996; ARBOLEDA & TRUJILLO, 2002). A tabela a seguir mostra a situação dos surtos ocorridos nos Estados Unidos entre os anos de 2004 – 2006 (TABELA 1).

Tabela 1: Surtos de estomatite vesicular ocorridos nos EUA entre 2004 – 2006.

Ano	2004	2005	2006
Locais afetados	294 propriedades (3 estados – 43 municípios)	445 propriedades (9 estados – 69 municípios)	9 propriedades (1 estado – 2 municípios)
Bovinos infectados	63	202	10
Bovinos susceptíveis	6101	13.285	485
Equinos infectados	405	584	12
Equinos susceptíveis	2495	3677	255

Fonte: adaptado de www.usda.gov

A irregularidade na ocorrência dos surtos é uma característica marcante na estomatite vesicular. A tabela acima (TABELA 1) inclui números importantes entre os anos de 2004 a 2006, no entanto, a doença atingiu apenas sete animais em 2009 e quatro animais em 2010, todos equinos, nos EUA. Não foram encontrados dados referentes aos anos de 2007 e 2008 (USDA, 2010). Os últimos relatos da ocorrência da doença no Brasil foram em Tocantins e Goiás em 2008, mas não foram acessados os dados oficiais (MAPA, 2010).

1.3.2. Epidemiologia

A ocorrência da doença é anual ou em intervalos de 2 – 3 anos em áreas tropicais e subtropicais. Os intervalos geralmente são maiores nas regiões temperadas da América do Norte e da América do Sul quando comparados aos observados nas regiões tropicais (HANSON, 1981). Os surtos aparecem de forma repentina no verão, ocorrendo

simultaneamente em várias localidades de uma área delimitada. A distribuição geográfica é irregular e, com frequência, propriedades adjacentes não são afetadas (MASON, 1978).

O mecanismo de transmissão do vírus ainda é desconhecido, apesar do fato de que o vírus tenha sido isolado de moscas, mosquitos e outros insetos levar à hipótese de transmissão por artrópodes (COMER *et al.*, 1992; FRANCY *et al.*, 1988; OIE, 2008). Alguns estudos comprovaram que o VSV não é capaz de penetrar a pele intacta e também não é capaz de causar infecção por meio de alimentos ou reservatório de água (HANSON, 1981). É mais provável que a infecção natural ocorra por meio de lesões na língua, tetas ou na pele da banda coronária das patas entre os animais susceptíveis. Grande parte desses animais pode ser infectada pela via nasofaringeana (MASON, 1978).

A ocorrência aumentada dos casos de estomatite vesicular nos meses quentes e chuvosos, juntamente com a rápida difusão do vírus em grandes áreas de vasta vegetação e correntes de água reforçam a hipótese de que o VSV poderia ser transmitido por insetos (MASON, 1978). Isso explicaria a sazonalidade da doença (MASON *et al.*, 1976; ORREGO *et al.*, 1987) e teria sustentação no fato de que o vírus já foi isolado em artrópodes. A transmissão do VSV é frequentemente associada aos *Phlebotomus*, mas pouco se sabe sobre o mecanismo e os locais de multiplicação do vírus nesses insetos (WEAVER *et al.*, 1992). O VSV-I foi isolado de *Phlebotomus* e de mosquitos do gênero *Aedes* (MASON, 1978). O vírus já foi multiplicado em cultura de células de *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* (LETCHWORTH, 1999) e em células de *Drosophila melanogaster* (mosca das frutas). Já foi até demonstrada a importância da imunidade mediada por RNAi contra o VSV em modelo de *Drosophila* (MUELLER, 2010). As amostras VSV Indiana-1, Indiana-3 Alagoas e VSV-NJ são constantemente isoladas de *Phlebotomus* naturalmente infectados, em que a transmissão transovariana é demonstrada pelo isolamento do vírus em macho, tendo em vista que apenas as fêmeas se alimentam de sangue (COMER *et al.*, 1992). Foram evidenciadas a ocorrência de adaptação natural do VSV em células de artrópodes (LLEWELLYN, 2002) e a competência de vetores do gênero *Simulium* em transmitir o VSV em modelos animais (MEAD, 2006). Apesar desses achados, existem várias objeções a essa hipótese. Primeiramente, postula-se que equinos, bovinos e suínos não produziram viremia suficiente para infectar os artrópodes hematófagos e, portanto, estes animais seriam

hospedeiros terminais (ARBOLEDA & TRUJILLO, 2002). Outro fator a ser considerado é que a distribuição espacial da doença não é típica de uma doença transmitida por insetos, visto que regiões contíguas não são afetadas, além de não ter sido possível isolar o vírus de artrópodes durante a ocorrência de alguns surtos da doença (LETCHWORTH, 1999).

Outra hipótese é a de que o VSV seja um vírus de planta (MASON, 1978) e que os animais estão no final da cadeia epidemiológica. Dessa forma, em circunstâncias especiais, o vírus poderia passar por processos adaptativos para infectar animais, seguido de transmissão direta entre os animais susceptíveis. Durante uma epizootia em 1982 no oeste dos EUA, foram relatados casos de transmissão direta de animal para animal (SELLERS *et al.*, 1990).

1.3.3. Diagnóstico

A estomatite vesicular é clinicamente indistinguível de outras doenças vesiculares, como a febre aftosa, o exantema vesicular dos suínos e a doença vesicular dos suínos, quando equinos não estão envolvidos (OIE, 2008). Isso traz grandes implicações sócio-econômicas e, na falta de um diagnóstico clínico, o diagnóstico laboratorial torna-se urgente e imprescindível em caso de suspeita de estomatite vesicular (HOFNER *et al.*, 1994; De STEFANO *et al.*, 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 1993; ALONSO *et al.*, 1991).

A coleta de material clínico e a tecnologia utilizada para o diagnóstico de estomatite vesicular devem estar em concordância com a metodologia utilizada no diagnóstico de febre aftosa e de outras doenças vesiculares, com o objetivo de facilitar o diagnóstico diferencial dessas doenças vesiculares. É importante lembrar que o VSV pode infectar o ser humano e, portanto, precauções apropriadas e medidas de biossegurança devem ser adotadas durante a manipulação de material potencialmente infeccioso (OIE, 2008).

As melhores amostras para o diagnóstico incluem os fluidos vesiculares, o epitélio de vesículas não rompidas, o epitélio de vesículas recém rompidas ou *swabs* de vesículas rompidas. As amostras podem ser coletadas de lesões da boca, das patas, assim como de qualquer outra região com formação de vesículas. Quando as amostras de tecido epitelial não estão disponíveis, pode-se coletar amostra de fluido esôfago-faríngeo (OIE, 2008).

A estomatite vesicular pode ser diagnosticada através da identificação ou isolamento viral. O isolamento pode ser feito pela inoculação em cultura de células ou em ovos embrionados. A inoculação pode ser feita em células Vero (células de rim de macaco verde africano), em BHK-21 (células de rim de hamster) ou em IB-RS-2 (células de rim de suíno). A inoculação nas três linhagens celulares permite uma diferenciação das doenças vesiculares, já que o VSV causa efeito citopático nas três linhagens, enquanto que o vírus da febre aftosa causa efeito em BHK-21 e IB-RS-2, e o vírus da doença vesicular suína causa efeito citopático apenas em IB-RS-2.

O VSV replica e pode ser isolado em ovos embrionados de oito a dez dias por meio de inoculação na cavidade alantóide, em camundongos desmamados com idade entre dois a sete dias pela inoculação por qualquer via, ou em camundongos com idade de três semanas por inoculação intracerebral. Em todos os três casos, o vírus causa a morte entre dois e cinco dias após a inoculação (OIE, 2008).

A identificação do vírus pode ser feita pela fixação de complemento (FEDERER *et al.*, 1967; ALONSO, 1986), ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (ALONSO *et al.*, 1991), imunofluorescência com anticorpos monoclonais e soroneutralização (FEDERER *et al.*, 1967; ALONSO, 1986).

O ELISA, através da detecção de antígenos virais em suspensão, é atualmente o método de escolha para a identificação do VSV. A técnica permite a identificação dos subtipos representativos de VSV-I, por meio da utilização de anticorpos polivalentes e ainda é capaz de detectar o VSV-NJ, com a utilização de anticorpos monovalentes (ALONSO, 1991). O ELISA é preferível ao teste de fixação do complemento pela maior sensibilidade e por não ser afetado por fatores anti ou procomplemento. Entretanto, quando o ELISA não está disponível, o teste de fixação do complemento pode ser realizado. De maneira geral, técnicas moleculares como a PCR ainda não estão sendo utilizadas na rotina como método diagnóstico para a estomatite vesicular (OIE, 2008).

Quando não é possível fazer a coleta de amostras para a identificação do agente, amostras de soro de animais recuperados podem ser utilizadas para a detecção e quantificação dos anticorpos específicos. Amostras de soro de um mesmo animal, coletadas com um intervalo de 1 a 2 semanas entre as coletas são preferenciais, pois podem apontar um aumento no título de anticorpos, o que pode ser um indicativo de infecção recente. Geralmente, os anticorpos podem ser detectados entre cinco e oito dias

após a infecção. A detecção e a quantificação de anticorpos no soro podem ser feitas por meio de testes de ELISA e soroneutralização. A fixação de complemento pode ser utilizada quando a coleta do soro for feita logo após o início da infecção (OIE, 2008).

O ELISA utilizado nesse caso é do tipo competitivo, para a detecção de anticorpos. A técnica também permite a detecção dos sorotipos VSV-I e VSV-NJ, por meio da utilização de antígenos recombinantes. A soroneutralização é feita em microplacas de cultura de tecidos, utilizando soro inativado como amostra. No procedimento são utilizados os sorotipos VSV-I e VSV-NJ, juntamente com células VERO ou IB-RS-2. O teste de fixação do complemento pode ser utilizado para a quantificação de anticorpos no início da infecção, principalmente da classe IgM. Entretanto, o método apresenta baixa sensibilidade e é frequentemente afetado por fatores inespecíficos (OIE, 2008).

Atualmente, a caracterização de agentes infecciosos vem sendo realizada por meio de técnicas moleculares (RODRIGUEZ-SANCHEZ, 2008). Uma das mais utilizadas é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), um método de diagnóstico rápido e sensível, onde uma região do genoma viral pode ser detectada em vários tipos de espécimes clínicos. A PCR está substituindo os métodos clássicos de detecção do agente infeccioso. As vantagens incluem a utilização tanto de tecido epitelial quanto de suspensão viral inativada, diminuindo os riscos biológicos à saúde humana e animal, além de poder ser feita em áreas livres ou exóticas da doença (THOMPSON *et al.*, 1999). Apresenta também uma alta sensibilidade, principalmente no caso da qPCR, podendo detectar o material genético do vírus mesmo se estiver presente em pequena quantidade na amostra, além da rapidez, por não depender de cultivo. Outro fator importante a ser considerado é que, na maioria das vezes, as amostras de campo chegam ao laboratório em condições inadequadas de conservação, o que dificulta o isolamento do agente devido à contaminação bacteriana ou a compostos citotóxicos, como os antissépticos utilizados nos rebanhos para tratar as lesões dos animais. Esses fatores não afetam a PCR em um nível significativo (RODRÍGUEZ *et al.*, 1993).

Várias reações de RT para detecção de VSV já foram descritas na literatura (RODRÍGUEZ *et al.*, 1993; HOFNER *et al.*, 1994; NÚÑEZ *et al.*, 1998; RASMUSSEN *et al.*, 2005; HOLE *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-SANCHEZ, 2008). Há um esforço em escala mundial para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, que possibilitem um resultado mais rápido e confiável, para evitar possíveis perdas

econômicas drásticas, principalmente quando envolve doenças como estomatite vesicular ou febre aftosa (BELÁK, 2007).

O qPCR inclui vantagens como a possibilidade de monitorar o progresso da reação de forma simultânea; mensurar precisamente a quantidade de produto de PCR em cada ciclo; apresentar uma maior amplitude de detecção; combinar os processos de amplificação e detecção em um mesmo tubo, o que elimina a necessidade de manipulações posteriores; possibilidade de um ensaio quantitativo eficiente; permite facilmente uma automatização do processo; e pode diminuir os custos do diagnóstico (BELÁK, 2007).

As técnicas moleculares como a PCR vem sendo muito utilizadas na caracterização de patógenos com posterior análise filogenética (RASMUSSEN, 2003 e 2004; HAKHVERDYAN, 2005 e 2006; BELÁK, 2007; ESCUTENAIRE, 2007). Essas ferramentas são muito úteis no estudo epidemiológico, resultando em um importante aporte na identificação, caracterização e possível rastreamento das fontes de disseminação do vírus (RODRIGUEZ-SANCHEZ, 2008). Podem auxiliar na vigilância da enfermidade e na detecção da fonte de infecção (THOMPSON et al., 1999).

1.3.4. Tratamento, controle e prevenção

O tratamento constitui-se no oferecimento de proteção aos animais acometidos por meio de acomodações adequadas, água fresca e alimentação tenra e rica. O fornecimento de alimentos de fácil apreensão e mastigação favorece a recuperação das lesões orais, abreviando, dessa forma, o período de anorexia. A administração de antibióticos pode ser necessária aos animais mais debilitados, tendo em vista o risco de aparecimento de infecções bacterianas secundárias. O uso de soluções polivitamínicas e repositoras de eletrólitos, de administração oral ou parenteral, pode ser necessário nos casos mais graves. De maneira geral, a estomatite vesicular apresenta um prognóstico favorável à sobrevivência dos animais (ABRAVEQ, 2010).

O controle de um surto de estomatite vesicular é feito através da quarentena dos animais suspeitos e o isolamento dos que foram comprovadamente afetados. Os órgãos oficiais do governo devem ser comunicados. A alimentação deve ser macia e fina para facilitar a cicatrização das lesões, evitando-se, dessa maneira, a disseminação prolongada do vírus. O alimento restante deve ser retirado frequentemente e o reservatório do mesmo deve

ser desinfetado. A desinfecção pode ser feita com formalina a 1%, soluções iodadas ou preparações fenólicas (ABRAVEQ, 2010).

A importância da estomatite vesicular deve-se não só por causar claudicações debilitantes nos equinos, mas pelo interesse no diagnóstico diferencial da febre aftosa em bovinos e suínos. A doença ainda pode causar grandes perdas econômicas na produção leiteira. Dessa forma, a Organização Mundial das Epizootias (OIE) considera a estomatite vesicular como uma doença da lista “A” em seu Código Internacional de Saúde Animal, o que determina, entre outras medidas, restrições à importação de bovinos, suínos e outras espécies, vivas, para a prevenção da transmissão do VSV (ABRAVEQ, 2010).

II. JUSTIFICATIVA

A estomatite vesicular é uma doença viral e contagiosa que acomete principalmente equinos, bovinos e suínos, podendo também afetar uma diversidade de animais domésticos e silvestres, além do homem. Atualmente é considerada uma doença presente apenas no continente americano. Os animais domésticos, principalmente os bovinos e suínos, são fontes importantes de proteína animal, sendo que o acometimento dos mesmos por doenças transmissíveis acarreta em grandes perdas econômicas e, conseqüentemente, diminuição da qualidade de vida da população.

A doença é conhecida por causar febre e formação de vesículas na mucosa da boca, epitélio lingual, lábios e região interdigital das patas e tetas. Os animais deixam de se alimentar e, conseqüentemente, perdem peso, o que pode afetar significativamente a lactação. A doença clínica normalmente é observada nos bovinos adultos, tendo em vista que as lesões são raramente observadas em bezerros. A forma subclínica também pode ser observada e se apresenta como um quadro de debilidade geral. A incidência da doença no rebanho é muito variada, atingindo de 5 a 50% e podendo chegar a 90% do rebanho. A mortalidade normalmente não ultrapassa 5%.

A estomatite vesicular tem sua importância reconhecida mundialmente no âmbito da saúde animal, principalmente pelas graves conseqüências sócio-econômicas associadas, haja vista que o animal acometido apresenta queda na produção de leite e carne. Além disso, a sua presença constitui um fator limitante para o comércio internacional de animais e seus subprodutos. O problema ainda vai além do prejuízo na produtividade do gado e assume um papel significativo para os programas de saúde animal, já que a estomatite vesicular é clinicamente indistinguível da febre aftosa em bovinos e suínos, sendo esta última uma doença vesicular severa que vem provocando grandes prejuízos na economia das Américas. Apesar de toda essa importância, a estomatite vesicular está incluída na lista das enfermidades de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), classificada como uma doença que pode se estender além das fronteiras nacionais, com graves conseqüências sócio-econômicas, sanitárias e no comércio internacional de animais e produtos derivados. Essa inclusão resulta na imposição de quarentena e na realização de testes para controle da doença.

O VSV pode ser isolado em cultivo celular a partir do material obtido das lesões dos animais ou identificado por técnicas sorológicas para detecção de antígenos virais, mas

esse processo, muitas vezes, é dificultado por causa do mal estado de conservação das amostras que chegam ao laboratório. Recentemente, tem crescido muito o interesse pelo uso de técnicas de biologia molecular para a identificação do VSV. A PCR, tanto convencional quanto em tempo real, tem sido a mais promissora, e pode ser realizada diretamente de amostras de tecidos ou através de extrações simples. A qPCR além de ser sensível e específica, é um método rápido e confiável, já que não necessita de etapas posteriores à reação. A obtenção do resultado pode ser mais rápida também pelo fato de os programas realizados nas máquinas de qPCR serem mais curtos. Essas características tornam o método bastante indicado, tendo em vista que o diagnóstico laboratorial é dado como urgente e imprescindível quando há suspeita de estomatite vesicular.

III. OBJETIVOS

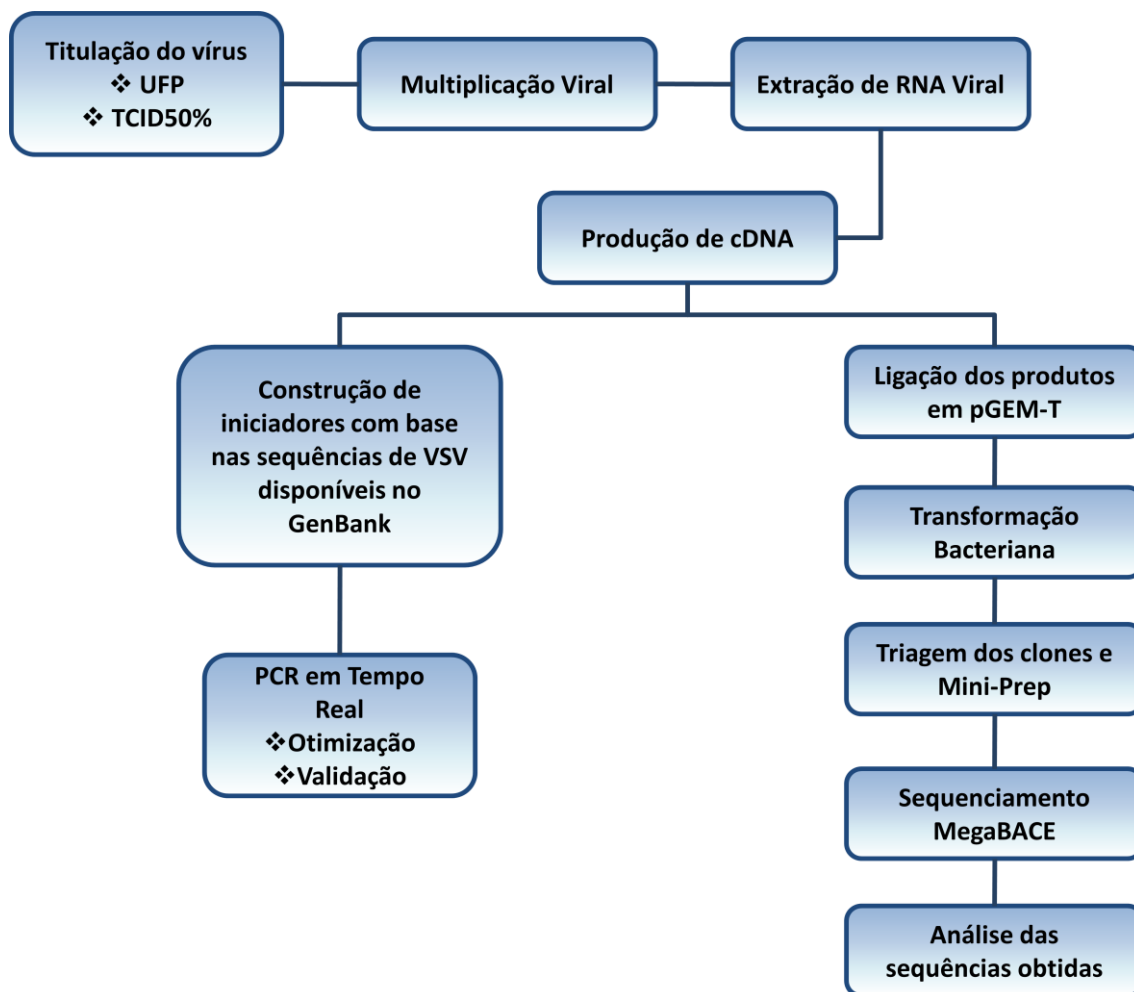
3.1. Objetivo Geral

- ❖ Desenvolver e padronizar uma reação de qPCR para diagnóstico da estomatite vesicular em bovinos.

3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Isolar, multiplicar e caracterizar uma amostra de VSV que será utilizada como controle positivo para padronização da reação de PCR;
- ❖ Analisar uma região propícia para detectar o vírus e desenhar os iniciadores que serão utilizados nas reações de PCR;
- ❖ Otimizar a reação de qPCR para o gene *L* e determinar a sensibilidade e especificidade;
- ❖ Validar o teste através da utilização de amostras clínicas.

IV. FLUXOGRAMA DE TRABALHO



V. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Células Vero

As células de linhagem contínua Vero são derivadas de epitélio de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, USA, passagem 126. Essas células foram cultivadas em meio 199 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (CULTILAB, Brasil), gentamicina (50mg/L), penicilina potássica (200U/mL) e fungizona (2.5mg/L). As células foram incubadas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂. Os subcultivos foram realizados em intervalos de 3 dias após o implante das células, utilizando-se solução de tripsina EDTA [NaCl 136mM; KCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 (Difco); EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol]. Essa linhagem celular foi utilizada para a multiplicação e a titulação do VSV.

5.2. Vírus

5.2.1. Origem

A amostra de VSV utilizada é proveniente do Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG e corresponde à amostra VSV-I ATCC VR-1238 (Indiana Lab [V-520-001-522]). As amostras de VSV foram armazenadas à temperatura de -70°C e, portanto, foi feita uma primeira passagem em monocamada de células Vero com o objetivo de avaliar a viabilidade das partículas virais. O ensaio foi feito em placas de 6 poços contendo a monocamada de células Vero, que foram infectadas com a amostra do vírus diluída com igual volume de meio 199 a 0% SFB (volume final de 300 µL). Após um período de adsorção de 1 hora e homogeneização em intervalos de 10 min, foi acrescentado o meio 199 a 1% SFB e as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em ambiente com 5% de CO₂. O efeito citopático (ECP), arredondamento de células, aumento da refringência e desprendimento das mesmas, foi observado de 2 em 2 h nas primeiras 8 h de incubação, sendo que o sobrenadante da monocamada foi coletado quando observou-se um ECP de 90%. O material foi armazenado à temperatura de -70°C para posterior titulação.

5.2.2. Titulação do vírus

5.2.2.1. Titulação viral por contagem de UFP

Após a multiplicação, o vírus obtido foi titulado em células Vero. Para isso, foram utilizadas placas de 6 poços contendo a monocamada de células que foram infectadas com as diluições seriadas do vírus. As células foram infectadas com 300 µL de cada diluição do vírus em meio 199 por 1 hora. Após a adsorção, foi acrescentado o meio 199 suplementado com 2% de SFB e CMC a 1,5%. As células foram mantidas a 37°C, em ambiente com 5% de CO₂ por 72 h e observadas ao microscópio em intervalos de 24 horas. Após 72 h, as células foram fixadas em solução de formol a 10% por 30 min. Em seguida, a monocamada foi corada com solução contendo 1% (p/v) de cristal violeta em PBS por 15 min. O título foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP) obtido nas câmaras cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL.

5.2.2.2. Ensaio de formação de cometas

Foi feito um ensaio de formação de cometas, para auxiliar na caracterização da amostra de VSV utilizada. O teste é útil para avaliar a infectividade viral e possui resultados conhecidos para o VSV (ZHU & YIN, 2006). Para isso, foi utilizada uma placa de seis poços contendo a monocamada de células Vero, sendo posteriormente infectada com as diluições do vírus. As células foram infectadas com volumes de aproximadamente 300 µL de cada diluição do vírus em meio 199 por 1 hora. A amostra de vírus utilizada foi o VSV-I, com um título de $5,67 \times 10^8$ UFP/mL e as diluições foram feitas com o objetivo de inocular as seguintes quantidades de partículas infectantes: 5 UFP, 50 UFP, 150 UFP, 300 UFP e 500 UFP. Após a adsorção, foi acrescentado o meio 199 suplementado com 1% de SFB. As células foram mantidas a 37°C, em ambiente com 5% de CO₂ por 24 h. Após 24 h, as células foram fixadas em solução de formol a 10% por 30 min. Em seguida, a monocamada foi corada com solução contendo 1% (p/v) de cristal violeta em PBS por 15 min.

5.2.3. Multiplicação viral

O vírus foi multiplicado em células Vero com aproximadamente 95% de confluência. Estas foram infectadas com o VSV, utilizando-se a m.o.i. de 0,01 em meio 199 por 1 hora. Após a adsorção, foi adicionado meio 199 com 1% SFB e as células foram

mantidas à 37°C sendo observadas ao microscópio óptico até atingir 90% de efeito citopático (ECP), quando os sobrenadantes foram coletados e armazenados à temperatura de -70°C.

5.3. Extração de RNA viral

Para a extração de RNA do vírus inoculado em célula Vero foi utilizado o Kit QIAmp[®] Viral RNA (QIAGEN[®], U.S.A.). Cerca de 140 µL da suspensão de células incubadas por 24 h foram lisados pela solução tampão AVL e, após a lise, as amostras foram aplicadas a uma coluna com afinidade para o RNA e submetidas a uma centrifugação de 8.000 x g, por 1 min. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes: a primeira com a solução tampão AW1 e a segunda com a solução tampão AW2. Após o processo de lavagem, o RNA foi eluído da coluna, pela solução AVE e estocado a -70°C.

5.4. Produção de cDNA

O RNA extraído serviu de molde para a produção de uma cadeia complementar de DNA (cDNA) utilizando a enzima M-MLV RT com o iniciador senso VSV (TABELA 2).

Para a produção de DNA complementares (cDNA), cerca de 1 a 5 µg de RNA extraído foi incubado a 70°C por 5 min, juntamente com o iniciador senso do VSV (2,5 pmol/µL) (TABELA 2). Após incubação em banho de gelo, os seguintes componentes foram adicionados à reação: 4 µL de tampão de RT 5X (Tris a 250mM pH 8.9, MgCl₂ a 15mM, KCl a 375mM, DTT a 50mM), 2 µL de dNTP (10mM) e 0,5 µL (20U) de RNAsin (Ribonuclease Inhibitor-Promega), seguido por incubação a 42°C por 5 min. No terceiro ciclo foi adicionado 1 µL (200U) de enzima M-MLV RT (200U/µL) (Promega Corporation-EUA). Essa mistura foi incubada por 50 min a 42°C e posteriormente a 70°C por 15 min, sendo então resfriada em banho de gelo.

O produto da transcrição reversa, designado de cDNA, foi conservado à temperatura de -70°C até sua utilização.

5.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

O cDNA obtido no processo anterior foi utilizado em uma reação de PCR com o objetivo de caracterizar a amostra de VSV utilizada como padrão do teste de qPCR e construção de um plasmídeo, utilizado como controle positivo da qPCR.

A utilização do plasmídio se justifica pela grande estabilidade do produto e facilidade de armazenamento, além do alto grau de pureza e facilidade de quantificação em espectrofotômetro. Além disso, sua utilização dispensa a necessidade de manipulação de partículas virais e material genético viral para a realização dos testes.

Os iniciadores utilizados nesse processo reconhecem uma região conservada do gene *L* (polimerase) do VSV (TABELA 2). O gene *L* do VSV apresenta certo grau de conservação e constitui um bom candidato como alvo de ensaios com objetivo de diagnóstico (RODRIGUEZ, 2002). É importante mencionar que a região contida no plasmídio foi utilizada posteriormente como molde para a confecção dos iniciadores da qPCR.

Os iniciadores utilizados, VSV senso e anti-senso, foram descritos em um trabalho de um grupo de pesquisa canadense (HOLE, 2006). Foram selecionados os iniciadores desenhados para o VSV-I e a reação resultou na amplificação de um fragmento de 227 pb, que foi utilizado nas próximas etapas de clonagem e sequenciamento. Os iniciadores utilizados estão especificados na TABELA 2.

Tabela 2: Relação dos iniciadores a serem utilizados na amplificação do gene *L* do VSV.

Primer	Sequência	Posição no genoma*	Tamanho amplicon (pb)	Referência
VSV senso	5'-TGATACAGTACAATTATTTGGGAC-3'	7230	227	Hole <i>et al.</i> , 2006
VSV anti-senso	5'-GAGACTTTCTGTTACGGGATCTGG-3'	7456		

* As posições foram numeradas de acordo com a sequência do VSV Indiana-1 (número de acesso no GenBank: J02428).

As condições salinas e enzimáticas utilizadas na reação são descritas a seguir. Foram utilizados 1,5mM de MgCl₂, 20mM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 2,0 µL de Tampão 10X (0,1M Tris pH 8,3, 0,5M KCl e 0,1% Triton X100), 10 pmol/100µL de cada iniciador e 1,0 µL de amostra, em um total de 20 µL de reação.

As temperaturas de pareamento e quantidade de ciclos da PCR foram adaptadas a partir das padronizações dos autores. A reação de PCR foi processada em um termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Os fragmentos amplificados foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose a 1% em TAE 1X (0,04M Tris-Acetato; 0,001M EDTA). O gel foi submetido à voltagem de 100V imerso em solução de TAE. Foram aplicados 10 µL do produto da reação, misturados a 1,0 µL do tampão de corrida (Azul de Bromofenol 2,5%, TAE 10X e glicerol 50%) e 1,0 µL de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA). As bandas foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta. Também foi incluído no gel um padrão de tamanho molecular 100 pb DNA *Ladder* (Promega, Madison, WI U.S.A.) para identificação do tamanho do produto.

Os produtos amplificados que apresentaram bandas na altura esperada foram recuperados do gel e purificados para posterior ligação ao vetor pGEM-T.

5.5.1. Extração de DNA do gel

A recuperação do produto específico amplificado, a partir do fragmento de gel foi feita utilizando o Gel Extraction Kit (QIAGEN®, U.S.A.). Todos os procedimentos foram feitos seguindo o protocolo do fabricante. O fragmento de gel excisado apresentava 420 mg e, no primeiro passo, foram acrescentados 420 µL do tampão QG. A mistura foi incubada por 10 min a 50°C, sendo homogeneizada no meio do intervalo. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de isopropanol e a preparação foi homogeneizada e transferida para uma mini-coluna. Nesta etapa, foi feita uma centrifugação de 13000 rpm por 1 min, sendo descartado o eluato. Foram acrescentados 500 µL de tampão QG na coluna e centrifugou-se novamente, descartando o eluato obtido. Um volume de 750 µL de tampão PE foi acrescentado na coluna e centrifugou-se novamente, descartando o eluato. Trocou-se o tubo coletor e adicionou-se 30 µL de água. Novamente, foi feita uma centrifugação de 13000 rpm por 1 min. A coluna foi descartada e o DNA do extrato foi dosado através do espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). O extrato obtido foi armazenado a -20°C.

5.6. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T

Os produtos obtidos na reação de PCR foram inseridos no plasmídeo pGEM-T de acordo com a técnica descrita pelo fabricante do kit pGEM-T easy vector system (Promega Corporation, EUA). A quantidade de inserto utilizada depende da concentração de DNA na amostra e permaneceu na proporção de 3:1 (inserto:plasmídeo) na reação de ligação.

A montagem da reação consiste em 5,0 µL de tampão de ligação 2X (60mM TRIS-HCl pH 7,8; 20mM MgCl₂, 20mM DTT, 2mM ATP, 10% polietilenoglicol), 1,0 µL de pGEM-T (50 ng), 1,0 µL de T4 DNA ligase, a quantidade calculada de inserto e água para completar um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e o produto de ligação foi utilizado para transformação de *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes.

5.7. Transformação Bacteriana (SAMBROOK *et al*, 1989)

O produto da ligação entre o fragmento de PCR e o vetor pGEM foi utilizado para a transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimicamente competentes, preparadas conforme o protocolo descrito por SAMBROOK e colaboradores (1989).

Para a transformação, foram utilizados 5,0 µL do material proveniente da ligação e 100 µL de bactéria competente DH5α descongelada em banho de gelo. Os tubos foram levemente agitados e incubados em banho de gelo por 30 min. Após essa etapa de incubação, foi feito o choque térmico incubando-se os tubos por 3 min a 42°C e novamente resfriados em banho de gelo por 2 min. Em seguida, foi adicionado 1,0 mL de meio LB 1X sem antibiótico a cada tubo e os mesmos foram incubados a 37°C por 1 hora (HANAHAN *et al.*, 1991). A cultura bacteriana resultante foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 min. O volume de 1,0 mL do sobrenadante foi removido e os 100 µL restantes foram utilizados para ressuspender o sedimento. Todo o volume da suspensão bacteriana foi plaqueado em meio LB-ágar (1% bacto-triptona; 0,5% bacto-extrato de levedura; 1% NaCl; 1% Ágar) contendo ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Paralelamente, foi feito o controle do crescimento de bactérias competentes não transformadas em placa LB-ágar na presença de ampicilina.

5.8. Triagem das colônias

As colônias foram selecionadas e multiplicadas em 1,0 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL). Os tubos foram incubados em um agitador (Shaker Superohm g-25, Brasil) por 4 horas a 37°C com agitação de 180 rpm. As culturas bacterianas resultantes foram utilizadas em reações de PCR com iniciadores específicos para o fragmento de interesse. Alíquotas de 1,0 µL da cultura bacteriana foram utilizadas como

moldes nas reações de PCR em um volume final de 20 μ L. Os produtos das reações de PCR foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% a 100V.

5.9. Obtenção de DNA plasmidial em pequena escala

Para a obtenção do plasmídeo em pequena escala foi utilizado o Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation – EUA). As bactérias foram crescidas em 10 mL de meio LB contendo ampicilina por 16 horas à temperatura de 37°C com agitação de 180 rpm. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Foi acrescentado ao sedimento 300 μ L de solução de ressuspensão com posterior homogeneização em agitador de tubos. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de solução de lise e a mistura foi homogeneizada por inversão do tubo por 4 vezes. Após essa etapa, foram adicionados 300 μ L de solução de neutralização, com homogeneização e centrifugação do material a 14.000 rpm por 15 min, em microcentrífuga Eppendorf 5415C. O sobrenadante foi transferido para uma coluna, onde foi centrifugado e lavado com 2,0 mL de solução de lavagem. O DNA foi eluído da coluna com água, por centrifugação a 14.000 rpm, e utilizado para dosagem em espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). O restante foi armazenado à temperatura de -20°C, até o seu uso no sequenciamento.

5.10. Sequenciamento

O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi descrito por SANGER e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar Mega Bace 1000 (Ge Healthcare), utilizando o kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (Mega BACE™), seguindo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Aproximadamente 200-400 ng do plasmídeo foram utilizadas na reação de sequenciamento, feita com os iniciadores universais do tipo M13. A reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços, em termociclador Eppendorf 96-well Mastercycler®, com o seguinte ciclo: desnaturação a 95°C por 25 s, pareamento do iniciador a 50°C por 15 s e extensão a 60°C por 3 min, sendo este ciclo repetido por 36 vezes. Em seguida, o produto do sequenciamento foi purificado por uma reação de precipitação utilizando acetato de amônio e etanol, e homogeneizado em tampão de amostra.

Os resultados do sequenciamento foram armazenados sob a forma de cromatogramas processados automaticamente pelo aparelho mencionado. As sequências foram manualmente inspecionadas para eliminar as regiões do vetor e as de baixa qualidade.

5.11. Análise das sequências

5.11.1. Montagem e edição das sequências nucleotídicas

A montagem e visualização das sequências finais foram obtidas a partir da análise dos cromatogramas, utilizando-se os programas Chromas Lite™ (Technelysium Pty Ltd) e CAP3 *Sequence Assembling Program* (HUANG & MADAN, 1999), através da *homepage* da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) do Brasil (disponível em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>).

5.11.2. Busca de similaridade em bancos de dados

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de VSV depositadas no GenBank, utilizando-se os programas BLASTn e BLASTx (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

5.11.3. Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram realizados com o auxílio do programa MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), utilizando-se o parâmetro Clustal W versão 1.6 (THOMPSON *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 2008; <http://megasoftware.net>).

5.12. qPCR

5.12.1. Desenho dos iniciadores

Os iniciadores utilizados no qPCR foram desenhados, partir da sequência incorporada no plasmídeo. Exigências importantes para a melhor execução da qPCR que são: fragmento com tamanho entre 80-250pb, tamanho dos iniciadores entre 18-24 nt, ausência de estruturas secundárias internas, ausência de grandes repetições de bases, diferença de Tm menor do que 5°C entre os dois iniciadores, conteúdo de GC em torno de 50%, preferência por sequências ricas em GC na porção 3' terminal no iniciador e evitar a complementaridade de bases entre as sequências dos iniciadores (formação de

dímeros) foram consideradas, assim como a capacidade de detectar amostras naturais de VSV, tendo em vista que o teste possui objetivo diagnóstico.

Para isso, foram utilizadas as sequências presentes no GenBank do VSV Indiana I (J02428), que representa a amostra protótipo laboratorial, de onde foi amplificada a sequência presente no plasmídeo; do VSAV (EU373658) e do COCV (EU373657), sendo que esses últimos apresentam grande relevância de circulação na América do Sul e representam amostras de isolados naturais do VSV (PAUSZEK, 2008). Foi feito o alinhamento das três amostras de VSV através do programa BioEdit (HALL, 1999), levando em consideração apenas a região correspondente ao plasmídeo com o inserto do VSV, ou seja, uma região conservada do gene *L* (polimerase) com 227 pb (FIGURA 6).

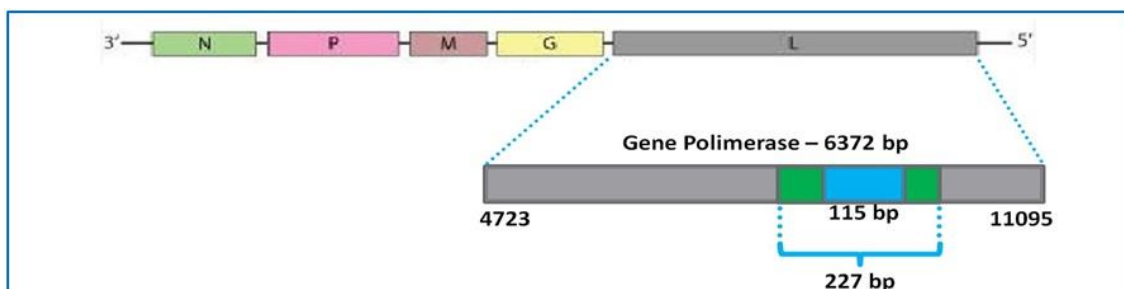


Figura 6. Esquema dos iniciadores utilizados para amplificar uma região do gene da Polimerase viral.

5.12.2. Gradiente de temperatura para os iniciadores VSV RT F e VSV RT R

Foi feito um teste de gradiente de temperatura por PCR convencional para testar a funcionalidade dos iniciadores utilizados no qPCR. As temperaturas testadas variaram de 55 a 64,9°C, e as condições salinas e enzimáticas utilizadas são descritas a seguir. Foram utilizados 1,5 mM de MgCl₂, 50 µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase, 2,0 µL de Tampão 10X, 10 pmol/100µL de cada iniciador e 1,0 µL de amostra, em um total de 20 µL de reação.

A PCR foi feita em 30 ciclos, com temperatura de desnaturação de 95°C por 30 s, temperatura de pareamento variando de 55 a 64,9°C por 10 s e temperatura de extensão de 72°C por 30 s. Foi feita uma extensão final de 72°C por 10 min. O controle negativo da reação foi feito com água estéril e para o controle positivo utilizou-se 2,0 ng de DNA plasmidial com o inserto do VSV.

Foi feita a eletroforese do produto final em gel de poliacrilamida a 8% em TBE 1X (Tris-Borato, EDTA). O gel foi submetido à voltagem de 100 V, imerso em solução de TBE. Foram aplicados 10 µL do produto da reação, misturados a 1 µL do tampão de corrida (Azul de Bromofenol 2,5%, TAE 10X e glicerol 50%). As bandas foram visualizadas através da coloração por prata. Também foi incluído no gel um padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Promega, Madison, WI U.S.A.) para identificação do tamanho do produto.

5.12.3. Teste do qPCR com os iniciadores VSV RT F e VSV RT R – mix caseiro

Foi feita uma reação de amplificação para testar a funcionalidade dos iniciadores desenhados para o qPCR. A reação foi feita de maneira arbitrária, com relação às concentrações dos reagentes, tendo em vista que todas as variáveis seriam padronizadas posteriormente. O mix da PCR foi preparado para um volume final de 20 µL, utilizando reagentes do laboratório, da seguinte maneira:

Tampão 10X.....	2 µL
MgCl ₂	1,8 mM
dNTP.....	50 µM de cada
VSV RT F.....	50 nM
VSV RT R.....	50 nM
Taq DNA polimerase.....	2U
Evagreen 20X.....	1 µL
H ₂ O q.s.p.....	20 µL
Amostra.....	1 µL

Em todas as qPCR do presente trabalho utilizando mix caseiro, as condições de termociclagem utilizadas foram as seguintes:

	95°C – 3 min	
Desnaturação	95°C – 15 s	
Pareamento	60°C – 15 s	45 ciclos
Extensão	72°C – 15 s	
Curva de dissociação		

Para essa reação, foram utilizados cDNA e o plasmídeo pVSV 15.8 em diferentes concentrações. O controle negativo da reação foi feito com água.

Todas as qPCR do presente trabalho foram feitas utilizando o termociclador *StepOne*[®] da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo *software StepOne*[®] versão 2.1 da Applied Biosystems.

5.12.4. Teste de sensibilidade utilizando mix comercial

Foram feitas três reações diferentes para testar os iniciadores (VSV RT F/R) e o plasmídeo (pVSV 15.8) quanto à sensibilidade, utilizando um Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems). Esse teste serve como comparativo em relação à reação feita com o mix caseiro. As diversas quantidades de DNA testadas foram obtidas a partir de diluições seriadas do plasmídeo pVSV 15.8. O mix foi preparado como se segue:

Master Mix 2X	5 µL
VSV RT F	100, 200 e 400 nM
VSV RT R	100, 200 e 400 nM
H ₂ O q.s.p	10 µL
Amostra	1 µL

As condições utilizadas para o Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) no presente trabalho foram as seguintes:

	95°C – 3 min	45 ciclos
Desnaturação	95°C – 30 s	
Pareamento e extensão	60°C – 60 s	
Curva de dissociação		

Para esse teste, foram utilizadas várias diluições de base 10 do pVSV 15.8, em uma escala de 10,0 ng/µL até 1,0 fg/µL de DNA. O controle negativo da reação foi feito com água.

5.12.5. Preparação de um pré-mix caseiro

Com o objetivo de aprimorar a reprodutibilidade do teste feito com o máster mix caseiro, foi feito um pré-mix da PCR, de forma que toda a padronização fosse feita utilizando esse mesmo mix. A produção do pré-mix poderia melhorar a reprodutibilidade do teste, através da redução dos erros de pipetagem e de uma maior homogeneidade dos reagentes.

O pré-mix foi preparado para uma quantidade de 500 reações:

Tampão 10X	1 mL
Evagreen 10X	0,5 mL
H ₂ O	0,5 mL
V _{final}	0,5 mL

O pré-mix foi produzido de maneira que, para 20 µL de uma reação, utilizava-se 10 µL do pré-mix e acrescentava-se o restante dos reagentes.

Esse pré-mix foi validado com uma reação teste no qPCR. Para isso, foram feitas três preparações: a primeira com uma concentração de iniciadores de 1,0 pmol/100 µL, a segunda com uma concentração de 2,0 pmol/100 µL, e uma terceira com 2,0 pmol/100 µL de iniciadores, mas com a utilização de uma *Taq* DNA polimerase comercial (*GoTaq* Promega®).

MIX	1	2/3
Pré-mix (2X)	50 µL	50 µL
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
dNTP	25 µM	25 µM
VSV RT F	1 pmol/100 µL	2 pmol/100 µL
VSV RT R	1 pmol/100 µL	2 pmol/100 µL
<i>Taq</i>	2 U	2 U
H ₂ O q.s.p	20 µL	16 µL
Amostra – 1 µL	-	-

Para cada mix, foi feita uma duplicata de controle negativo (H₂O) e uma duplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng).

5.12.6. Padronização – Curva de iniciadores

Após a etapa de validação do pré-mix, foi feita a primeira etapa de padronização dos reagentes do mix, através da curva de iniciadores. As etapas realizadas e quantidades de reagentes utilizadas foram obtidas da literatura e pela experiência do Laboratório de Vírus – ICB/UFMG (LUTFALLA & UZE, 2006; INVITROGEN, 2008; RAYMAEKERS, 2009).

Foi feita uma preparação intermediária a partir do pré-mix, com os reagentes de concentração invariável (Ex: dNTP e MgCl₂). Essa preparação foi aliquoteada para a posterior adição de diferentes quantidades de iniciadores e da água restante do mix.

Preparação do mix intermediário para 62 reações:

Pré-mix (2X)	620 µL
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	25 µM
<i>Taq</i> DNA polimerase	2 U

Foram feitas alíquotas desse mix para a adição dos iniciadores e água, sendo que cada alíquota continha volume suficiente para cinco reações. As quantidades de cada iniciador (VSV RT F/R) utilizadas nas diferentes reações estão dispostas a seguir:

(1) 0,5 pmol/100 µL	(5) 1,5 pmol/100 µL	(9) 2,5 pmol/100 µL
(2) 0,75 pmol/100 µL	(6) 1,75 pmol/100 µL	(10) 2,75 pmol/100 µL
(3) 1,0 pmol/100 µL	(7) 2,0 pmol/100 µL	(11) 3,0 pmol/100 µL
(4) 1,25 pmol/100 µL	(8) 2,25 pmol/100 µL	(12) 4,0 pmol/100 µL

Para cada mix, foi feita uma duplicata de controle negativo (H₂O) e uma duplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng).

5.12.7. Padronização – Curva de MgCl₂

Para a curva de concentração de MgCl₂ foram preparados dois mix intermediários, tendo em vista a utilização de duas concentrações diferentes de iniciadores a serem testadas. As preparações foram alíquotadas para adição posterior de MgCl₂ e da água restante do mix.

Preparação dos mix intermediários para 32 reações de cada:

	1	2
Pré-mix (2X)	320 µL	320 µL
dNTP	25 µM	25 µM
VSV RT F	0,75 pmol/100 µL	1,25 pmol/100 µL
VSV RT R	0,75 pmol/100 µL	1,25 pmol/100 µL
Taq DNA polimerase	2 U	2 U

Foram feitas alíquotas desses mix para a adição do MgCl₂ e água, sendo que cada alíquota continha volume suficiente para cinco reações. As quantidades de MgCl₂ utilizadas são descritas a seguir:

1	2	3	4	5	6
0,5 mM	1,0 mM	1,5 mM	1,8 mM	2,0 mM	3,0 mM

Vale lembrar que cada concentração de MgCl₂ foi testada para as duas concentrações de iniciadores. Para cada mix, foi feita uma duplicata de controle negativo (H₂O) e uma duplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng).

5.12.8. Padronização – Curva de dNTP

O passo seguinte no processo de padronização foi a curva de concentração de dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), após a definição de valores adequados para iniciadores e MgCl₂. Os valores de concentração de dNTP testados foram obtidos a partir de dados da literatura (LUTFALLA & UZE, 2006; INVITROGEN, 2008; RAYMAEKERS, 2009).

Novamente, foi preparado um mix intermediário com os reagentes de concentração fixa. Esse mix foi aliquoteado para a adição do dNTP na concentração correspondente e da água restante.

Preparação do mix intermediário para 54 reações:

Pré-mix (2X)	540 µL
MgCl ₂	2,0 mM
VSV RT F	1,25 pmol/100 µL
VSV RT R	1,25 pmol/100 µL
Taq DNA polimerase	2 U

Foram feitas alíquotas desse mix para a adição do dNTP e água, sendo que cada alíquota continha volume suficiente para cinco reações. As quantidades de dNTP utilizadas são descritas a seguir:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10 µM	15 µM	20 µM	25 µM	30 µM	35 µM	40 µM	50 µM	80 µM	100 µM

É importante notar que a concentração indicada acima representa o valor de cada nucleotídeo separadamente. Para cada mix, foi feita uma duplicata de controle negativo (H₂O) e uma duplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng).

5.12.9. Teste de sensibilidade utilizando mix caseiro

Depois de cumpridas as etapas de padronização do método, foi feito um teste de sensibilidade, semelhante ao teste realizado no item 5.12.4 com o mix comercial (SYBR Green[®] PCR Master Mix, Applied Biosystems). O objetivo foi comparar a eficiência do mix caseiro frente a um padrão comercialmente distribuído e comprovar, dessa maneira, a eficácia do teste diagnóstico padronizado neste presente trabalho.

As diversas quantidades de DNA testadas foram obtidas a partir de diluições seriadas do plasmídeo pVSV 15.8. O mix para 30 reações foi preparado como se segue:

Pré-mix (2X)	300 µL
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	10 µM
VSV RT F	1,25 pmol/100 µL
VSV RT R	1,25 pmol/100 µL
ROX (50X)	0,4 µL
Taq	2 U
H ₂ O	4 µL

É importante salientar que esse último mix apresenta o ROX dentre os seus reagentes. O ROX é um corante, utilizado como uma referência passiva nas reações de qPCR. Esse mesmo corante é utilizado como referência passiva no mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems). Para esse teste, foram utilizadas várias diluições de base 10 do pVSV 15.8, em uma escala de 10,0 ng/µL até 1,0 fg/µL de DNA. O controle negativo da reação foi feito com água.

5.12.10. Teste de especificidade da reação

O teste de especificidade tem o objetivo de avaliar o grau de reconhecimento específico da reação. Foram testados materiais de vírus e bactéria que podem causar sintomas semelhantes ao da estomatite vesicular. O teste não incluiu amostra do vírus da febre aftosa, tendo em vista que o laboratório não tem permissão para trabalhar com tal amostra, pois se configura com um Nível de Biossegurança tipo 2 (NB-2).

Nessa etapa foram feitos testes em pequena escala, com amostras positivas para agentes causadores de doenças confundíveis com estomatite vesicular. Nesse caso, foram testadas amostras dos seguintes agentes: *Vaccinia virus* (Família *Poxviridae*, Gênero *Orthopoxvirus*), *Orf virus* (Família *Poxviridae*, Gênero *Parapoxvirus*), *Bovine viral diarrhea virus 1* (Família *Flaviviridae*, Gênero *Pestivirus*), *Bovine herpesvirus 2* (Família *Herpesviridae*, Gênero *Simplexvirus*), *Bovine herpesvirus 1* e *Bovine herpesvirus 5* (Família *Herpesviridae*, Gênero *Varicellovirus*), *Bluetongue virus* (Família *Reoviridae*, Gênero *Orbivirus*) e uma amostra de *Staphylococcus aureus*.

As amostras relacionadas para o teste de especificidade foram tratadas adequadamente para a qPCR. Para as amostras de vírus com genoma de DNA (*Vaccinia virus*, *Orf virus*, *Bovine herpesvirus 2*, *Bovine herpesvirus 1* e *Bovine herpesvirus 5*) foram utilizados extratos de DNA, enquanto que para os vírus com genoma de RNA (*Bovine viral diarrhea virus 1* e *Bluetongue virus*) foram utilizados os cDNA obtidos a partir de

RT com iniciadores randômicos. Para a amostra de *Staphylococcus aureus*, foi utilizada uma diluição de 100 vezes do meio de cultura contendo o microrganismo.

A reação foi feita de acordo com os parâmetros encontrados na padronização do teste:

Pré-mix (2X)	1 X
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	10 µM
VSV RT F	1,25 pmol/100 µL
VSV RT R	1,25 pmol/100 µL
ROX (50X)	1 X
Taq	2 U
Amostra	1,0 µL
H ₂ O q.s.p.....	20 µL

A reação foi feita com uma triplicata de controle negativo (H₂O) e uma triplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng). Todas as amostras foram testadas em triplicata.

5.12.11. Teste de sensibilidade

O teste deveria ser validado com amostras clínicas suspeitas ou positivas para o VSV, mas isso não foi possível. As amostras suspeitas de todo o território nacional são enviadas para o LANAGRO em Recife-PE para proceder com o diagnóstico de doenças vesiculares. É importante ressaltar que os isolados naturais de VSV também necessitam de nível III de biossegurança (OMS, 2004).

Para avaliar a sensibilidade do teste em amostra clínica, foi feito um experimento de contaminação artificial de um material de origem bovina (crosta), utilizando a amostra laboratorial de VSV existente no laboratório. O material foi dividido em vários tubos (10 mg em cada) aos quais foram adicionadas as diluições seriadas do vírus. Para isso, foi utilizada a amostra VSV 9.28 obtida no item 5.2.3, com um título de $5,67 \times 10^8$ UFP/mL. O vírus foi diluído em meio 199 1X a 0% de SFB, e a quantidade de partículas virais em cada tubo variou de 10^7 a 10^{-3} UFP em diluições seriadas de base 10, sendo utilizados 100 µL de cada diluição. As contagens negativas se justificam pelo fato de que representam o número de partículas viáveis obtidas na titulação viral, ou seja, a quantidade de material genético do vírus poderia ser maior. A representação do conteúdo de cada tubo está descrita no quadro a seguir.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Quantidade de crosta (mg)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Volume da diluição de vírus (µL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Quantidade de vírus (UFP)	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	0

As preparações obtidas foram encaminhadas para a extração de RNA total.

5.12.12. Extração de RNA com TRIZOL®

A extração de RNA total foi feita com o reagente TRIZOL® (Invitrogen). As amostras (50 mg ou menos de tecido) foram homogeneizadas com 750 µL de TRIZOL® e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. Para a separação das fases, foi adicionado clorofórmio (200 µL) e as misturas incubadas à temperatura ambiente por 15 min. As preparações foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min à 4°C. Após a separação, a fase aquosa dos tubos, contendo o RNA, foi transferida para um novo tubo. A precipitação do RNA foi feita pela adição de 500 µL de isopropanol e incubação à temperatura ambiente por 10 min. As preparações foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min à 4°C. Após a remoção do sobrenadante, foi feita a lavagem do precipitado adicionando-se 1 mL de etanol a 75%, com posterior centrifugação a 7500 x g por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi novamente removido e fez-se a secagem do precipitado à temperatura ambiente por 5 – 10 min. A dissolução do RNA foi feita adicionando-se 50 µL de água livre de RNase/DNase. As preparações foram incubadas por 10 min à 55 – 60°C para dissolução completa do RNA. As soluções obtidas foram aliqüotadas e armazenadas à -70°C até a sua utilização.

5.12.13. Tratamento com DNase

Parte do extrato de RNA obtido foi tratado com DNase I (New England, BioLabs) antes da transcrição reversa. Esse procedimento poderia melhorar os resultados do qPCR e foi testado por esse motivo. Primeiramente, adicionou-se 3 µL do tampão 10X da enzima aos 27 µL da solução de RNA. Foi acrescido à preparação 1 µL de DNase I (2 U), com posterior incubação à 37°C por 10 min. Após a incubação, os tubos foram

colocados em banho de gelo, para a adição de 0,3 μL de EDTA a 0,5 M. Finalmente, foi feita uma incubação à 75°C por 10 min para inativação da enzima DNase I.

5.12.14. Teste da RT

Alguns testes para a transcrição reversa foram propostos, tendo em vista a importância da eficiência dessa etapa no processo de diagnóstico por PCR. Para isso, foram utilizadas quatro alíquotas de 200 μL do vírus VSV 9.28. Foi feita a extração de RNA com TRIZOL[®] como especificado no item 5.12.12, e o RNA obtido foi aliquoteado em volumes de 10 μL , para serem utilizados na RT. Os ensaios foram baseados na utilização de três tipos de iniciadores: os iniciadores randômicos, o VSV RT F e o Oligo dT.

As etapas comuns em todas as RT foram: utilização de 10 μL de extrato de RNA (1 a 5 μg de RNA) incubados a 70°C por 5 min, juntamente com os iniciadores. Após incubação em banho de gelo, os seguintes componentes foram adicionados à reação: 5 μL de tampão de RT 5X (Tris a 250 mM pH 8.9, MgCl_2 a 15 mM, KCl a 375 mM, DTT a 50 mM), 2 μL de dNTP (10 mM), 0,5 μL (20 U) de RNAsin (Ribonuclease Inhibitor-Promega) e 1 μL (200U) de enzima M-MLV RT (200U/ μL) (Promega Corporation-EUA). No caso dos iniciadores VSV RT F e Oligo dT o passo seguinte foi uma incubação de 60 min a 42°C, enquanto que para os iniciadores randômicos essa incubação foi de 60 min a 37°C. Os testes com os iniciadores foram feitos de acordo com a TABELA 3.

Tabela 3: Relação de iniciadores utilizados no teste de RT

	1	2	3	4	5	6
Iniciadores	Iniciadores randômicos (0,5 μg)	VSV RT F (2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	Oligo dT (2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)	VSV RT F (1,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) + Randômico (0,25 μg)	Oligo dT (2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) + Randômico (0,4 μg)	Oligo dT (2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) + VSV RT F (1,6 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$)
Temp. de incubação (°C)	37°C	42°C				

Em relação à TABELA 3, as quantidades de iniciadores utilizadas foram as seguintes: em (1), foram utilizados 0,5 μg de iniciadores randômicos; em (2) a concentração final de VSV RT F foi de 2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$; em (3) 2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ de Oligo dT; em (4) 1,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ de VSV RT F e 0,25 μg de iniciador randômico; em (5) 2,0 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ de Oligo dT e 0,4

µg de iniciador randômico; em (6) 2,0 pmol/µL de Oligo dT e 1,6 pmol/µL de VSV RT F.

O cDNA obtido foi utilizado em uma qPCR, com Master Mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) para avaliar a eficácia das diferentes RT.

O mix foi preparado como se segue:

Master Mix 2X.....	5 µL
VSV RT F.....	100 nM
VSV RT R.....	100 nM
H ₂ O q.s.p.....	10 µL
Amostra.....	1 µL

Para esta reação, foi feita uma duplicata de controle negativo (H₂O) e uma duplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng).

5.12.15. Curva de iniciadores utilizando amostra clínica

Foi feita uma curva de iniciadores utilizando amostra clínica para avaliar a eficácia da reação. O mix foi preparado de acordo com a padronização obtida anteriormente e depois foram adicionadas as diferentes quantidades de iniciadores, para cada mix separadamente. A reação foi feita da seguinte maneira:

Pré-mix (2X)	1 X
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	100 µM
ROX (50X)	1 X
<i>Taq</i>	2 U
Amostra	1,0 µL
H ₂ O q.s.p.....	20 µL

Nota-se que a quantidade de dNTP também foi alterada nesse mix, tendo em vista que, na padronização utilizando o plasmídeo, o gradiente de concentração de dNTP não afetou a sensibilidade da reação, mas esse fator pode ser preponderante em um teste com amostra clínica. Vale lembrar que a concentração de 100 µM também foi testada na padronização e funcionou normalmente.

As quantidades de cada iniciador (VSV RT F/R) utilizadas nas diferentes reações para o teste em amostra clínica estão descritas a seguir.

(1) 1,0 pmol/100 µL	(5) 3,0 pmol/100 µL	(9) 10,0 pmol/100 µL
(2) 1,5 pmol/100 µL	(6) 4,0 pmol/100 µL	(10) 20,0 pmol/100 µL
(3) 2,0 pmol/100 µL	(7) 5,0 pmol/100 µL	(11) 30,0 pmol/100 µL
(4) 2,5 pmol/100 µL	(8) 7,5 pmol/100 µL	(12) 40,0 pmol/100 µL

Para cada mix, foi feita uma duplicata de controle negativo (H₂O) e uma duplicata de controle positivo. Nesse caso, o controle positivo da reação foi o cDNA obtido a partir do tubo 1 do item 5.12.11 (Teste de sensibilidade), que consiste na amostra com maior quantidade de material genético viral daquele experimento.

5.12.16. Comparação entre amostras tratadas e não tratadas com DNase

No experimento do item 5.12.11, uma parte das amostras passou por uma etapa de tratamento com DNase. Após a extração de RNA, as amostras passaram pela etapa de transcrição reversa, que foi feita utilizando o iniciador VSV RT F, já que o mesmo se mostrou mais eficiente de acordo com os experimentos detalhados no item 5.12.14 (Teste da RT). O cDNA obtido desse processo, foi utilizado na qPCR com o mix otimizado. Foi feito um controle negativo da RT, obtido pela adição de todos os reagentes, menos a enzima M-MLV. O mix foi feito da seguinte maneira:

Pré-mix (2X)	1 X
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	100 µM
VSV RT F	4,0 pmol/100 µL
VSV RT R	4,0 pmol/100 µL
ROX (50X)	1 X
Taq	2 U
Amostra	1,0 µL
H ₂ O q.s.p.....	20 µL

Para esta reação, foi feita uma duplicata de controle negativo dos reagentes (H₂O), uma duplicata de controle negativo da RT e uma duplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng). As amostras também foram testadas em duplicatas e foram obtidas no experimento do item 5.12.11 (Teste de sensibilidade).

5.12.17. qPCR das amostras clínicas

Foi feita uma reação para testar a sensibilidade do método para as amostras obtidas no experimento do item 5.12.11 (Teste de sensibilidade). Após a extração de RNA, as amostras não tratadas com DNase passaram pela etapa de transcrição reversa, que foi feita utilizando o iniciador VSV RT F, já que o mesmo se mostrou mais eficiente de acordo com os experimentos detalhados no 5.12.14 (Teste da RT). O cDNA obtido desse processo, foi utilizado na qPCR com o mix otimizado. O mix foi feito como se segue:

Pré-mix (2X)	1 X
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	100 µM
VSV RT F	4,0 pmol/100 µL
VSV RT R	4,0 pmol/100 µL
ROX (50X)	1 X
<i>Taq</i>	2 U
Amostra	1,0 µL
H ₂ O q.s.p.....	20 µL

Para esta reação, foi feita uma triplicata de controle negativo dos reagentes (H₂O) e uma triplicata de controle positivo (pVSV 15.8 – 1,0 ng). As amostras também foram testadas em triplicatas e foram obtidas no experimento do item 5.12.11 (Teste de sensibilidade).

5.12.18. Genes de referência

Para cumprir com as necessidades exigidas, foram escolhidos dois genes bovinos altamente conservados para assumirem o papel de normalizadores da reação, a β -actina e a HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase I). Foram escolhidos os iniciadores específicos para cada um desses genes, que apresentam como função principal, a detecção de transcritos (RNAm) de origem bovina nas amostras, após a extração de RNA total. Foram escolhidos genes de origem bovina, por esta ser a espécie-alvo do presente trabalho.

5.12.18.1. β -Actina

Os iniciadores para a detecção de β -actina foram desenhados de acordo com as características preconizadas na qPCR. O objetivo dos iniciadores era detectar

sequências referentes ao RNA dos bovinos, principalmente RNAm. Para isso, foi utilizado o programa Clustal W versão 2.0 (LARKIN, 2007) para o alinhamento de sequências obtidas no GenBank. Nesse caso, foi feito o alinhamento entre as sequências de DNA e de RNAm da β -actina bovina. Os iniciadores foram desenhados a partir do RNAm, delimitando grandes regiões onde o DNA não é transcrito em RNA (*introns*). Dessa maneira, os iniciadores são capazes de detectar sequências de RNA e DNA dos bovinos, mas a presença do *intron* no DNA impede que este seja amplificado de maneira eficiente na qPCR.

Após o desenho dos iniciadores, foi feito um estudo das características gerais dos mesmos através do programa *Oligo Calc* (KIBBE, 2007), para certificar-se do cumprimento de requisitos básicos para os iniciadores utilizados em qPCR.

5.12.18.2. HPRT

Os iniciadores para HPRT bovina foram selecionados de uma publicação de Lisowski e colaboradores (LISOWSKI, 2008). O autor do trabalho utilizou uma técnica semelhante à apresentada no item anterior para desenhar iniciadores específicos para sequências oriundas de RNAm. Esses iniciadores também foram estudados através do programa *Oligo Calc* (KIBBE, 2007), para certificar-se do cumprimento de requisitos básicos para os iniciadores utilizados em qPCR.

VI. RESULTADOS

6.1. Passagem, multiplicação e titulação do VSV em monocamada de células Vero

Foi feita uma primeira passagem do vírus em monocamada de células Vero, como foi descrito no item 5.2.3. A amostra viral VSV 9.28, que estava armazenada no freezer a -70°C , logo apresentou efeito citopático significativo, como se pode notar pela FIGURA 7.

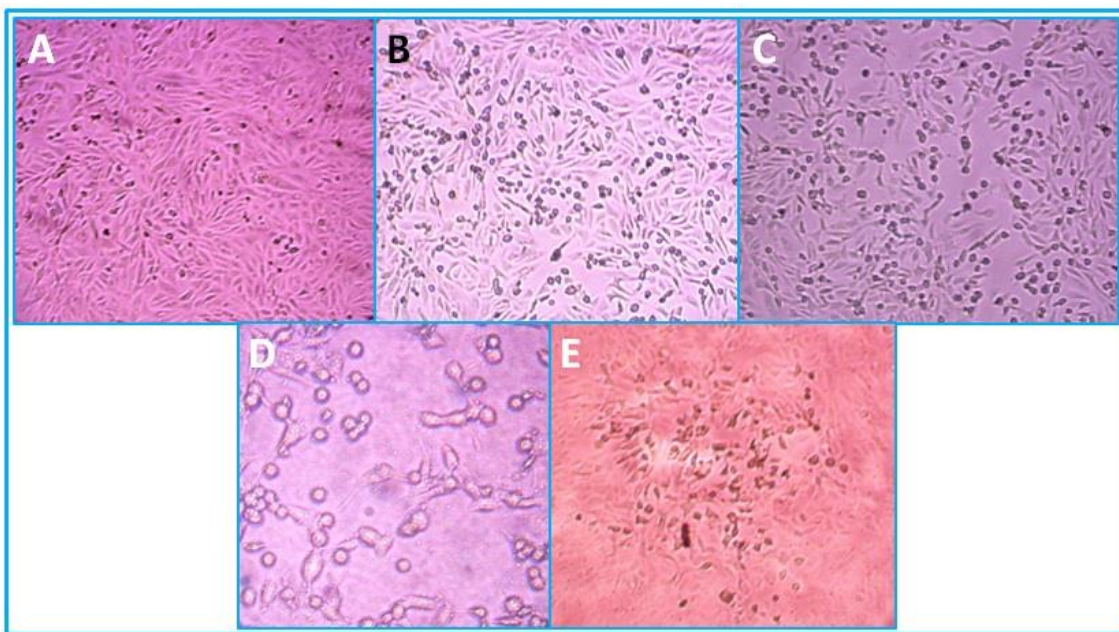


Figura 7. Efeito citopático de VSV em monocamada de células Vero. (A) Monocamada de células Vero não infectada; (B) Efeito citopático inicial na monocamada (~8 horas p.i); (C) Efeito citopático intermediário (~12 horas p.i); (D) Efeito citopático avançado (~20 horas p.i); (E) Placa de lise viral em monocamada de células Vero, utilizando suporte semi-sólido (CMC).

Quando o efeito citopático atingiu em torno de 90% da monocamada de células, o sobrenadante foi coletado e armazenado a uma temperatura de -70°C até sua utilização.

Após essa primeira passagem cega, foi necessário calcular o título do VSV no sobrenadante coletado, já que o próximo passo de multiplicação viral seria feito utilizando uma m.o.i de 0,01. Uma alíquota do sobrenadante foi titulada, como descrito no item 5.2.2.1, e o título obtido foi de $1,42 \times 10^8$ UFP/mL.

Com base no título viral, foi feita uma multiplicação em monocamada de células Vero, com uma m.o.i de 0,01, como descrito no item 5.2.3. Ao final dessa etapa, foram

coletados 30 mL de sobrenadante contendo o VSV. Esse sobrenadante foi alíquotado e armazenado a uma temperatura de -70°C até sua utilização.

Foi feita uma nova titulação, dessa vez para avaliar o título do *pool* trabalho e a eficiência do processo de multiplicação viral. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para tal procedimento e o título obtido foi de $5,67 \times 10^8$ UFP/mL. O resultado da titulação viral pode ser visto através da placa fixada e corada, FIGURA 8.

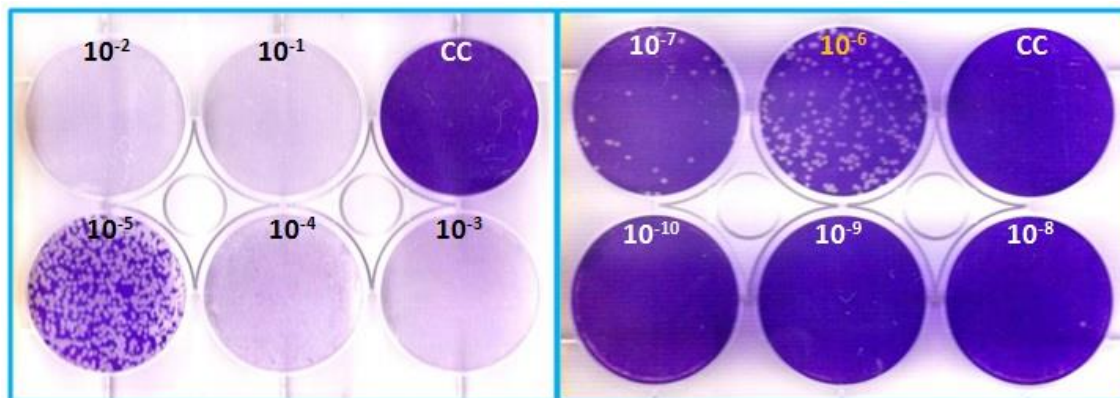


Figura 8. Placas de titulação do VSV 9.28 coradas com cristal violeta. O poço destacado em amarelo (10^{-6}) representa onde foi feita a contagem das placas de lise.

6.2. Ensaio de formação de cometas

Para auxiliar na caracterização da amostra viral, foi feito um ensaio de formação de cometas em monocamada de células Vero, de acordo com o protocolo proposto por ZHU & YIN e conforme descrito no item 5.2.2.2. Como era esperado para o VSV, houve a formação dos cometas, o que pode ser visto pela FIGURA 9 a seguir.

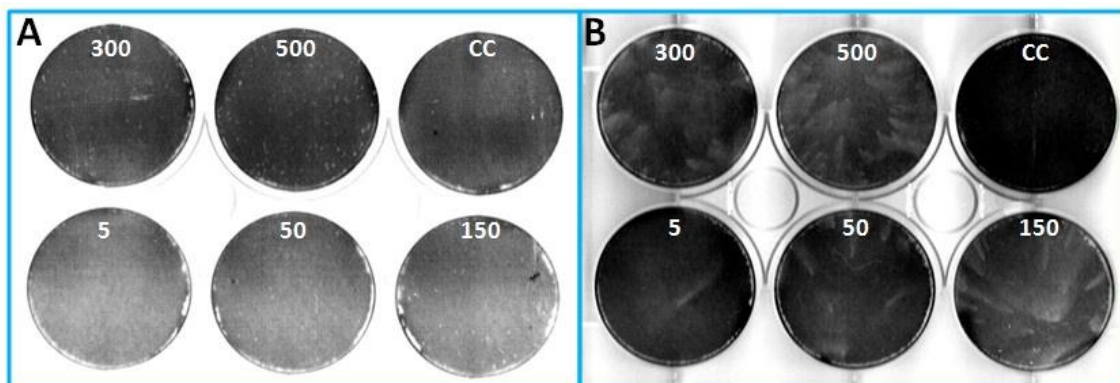


Figura 9. Placas com resultado do ensaio de formação de cometas coradas com cristal violeta. A) Placa com meio semi-sólido; B) Placa com meio líquido. Coloração da figura em escala de cinza.

É fácil notar a diferença no resultado da multiplicação viral quando se compara o ensaio feito com suporte de meio líquido em relação ao suporte semi-sólido (FIGURA 9). Com a utilização do suporte semi-sólido, o resultado final é a formação de uma placa de lise arredondada e bem definida. A utilização do meio líquido permite a disseminação do vírus pela monocamada, o que resulta na formação de imagens parecidas com cometas. Vale lembrar que a disseminação do vírus ocorre na direção da cabeça para a cauda do “cometa” (ZHU & YIN, 2006).

6.3. Extração de RNA viral

A extração de RNA viral do sobrenadante obtido no item 5.2.3 foi feita com o kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, U.S.A.), como descrito no item 5.3. Foi mensurada a concentração de RNA no extrato obtido utilizando o espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). A concentração de RNA encontrada foi de 78,2 ng/μL em um total de 50 μL de eluato.

6.4. Produção de cDNA, PCR convencional e extração de DNA do gel

O extrato de RNA obtido anteriormente foi utilizado para a produção do cDNA, utilizando o iniciador VSV F, como descrito detalhadamente no item 5.4. Não foi feita dosagem do cDNA produzido, mas a eficiência da RT foi avaliada indiretamente através da PCR convencional.

O cDNA obtido foi utilizado em uma PCR convencional, com o objetivo de amplificar uma sequência específica do VSV delimitada pelos iniciadores VSV F/R, como descrito no item 5.5. Uma primeira reação foi feita para testar a qualidade dos iniciadores e do cDNA, sendo que o resultado foi a amplificação bastante eficaz do fragmento esperado de 227 pb, como pode ser visto na FIGURA 10. A banda que aparece próximo de 500 pb na amostra apresentada na FIGURA 10 é de origem desconhecida e não interferiu nos resultados.

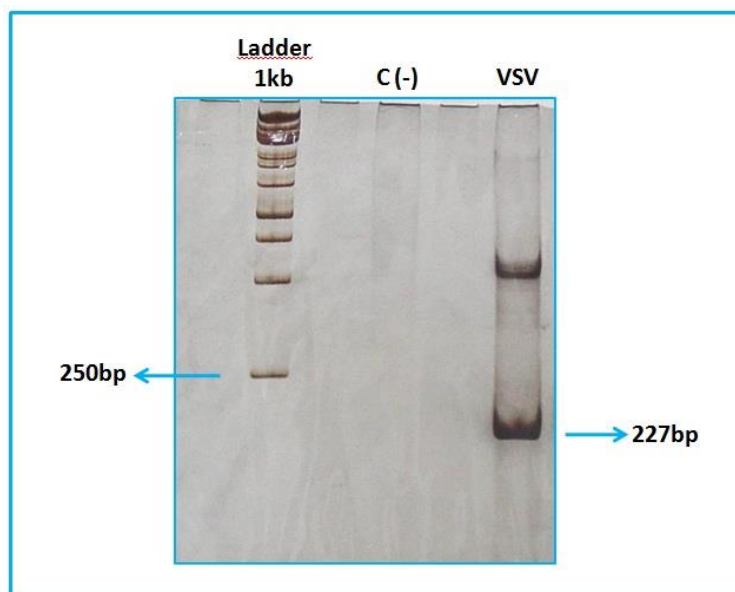


Figura 10. Gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. C(-): controle negativo da reação; VSV: controle positivo com o fragmento específico do VSV (227pb) em destaque; *Ladder* 1Kb: padrão de tamanho molecular.

Foi feita outra reação, utilizando os mesmos parâmetros da reação anterior, com o objetivo de amplificar o material genético a ser utilizado na ligação ao vetor pGEM-T. A eletroforese dos produtos amplificados foi feita em agarose a 1% e as bandas correspondentes ao fragmento de tamanho esperado (227 pb) foram recuperadas do gel. A extração de DNA do gel foi feita utilizando o Gel Extraction Kit (QIAGEN®) e o DNA do extrato foi dosado através do espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies). A concentração de DNA obtida no extrato foi de 17,1ng/μL.

6.5. Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T, transformação bacteriana e triagem das colônias

A ligação dos fragmentos de DNA ao vetor pGEM-T foi feita utilizando 1 μL do extrato de DNA obtido anteriormente. Todo o volume da reação foi utilizado no processo de transformação bacteriana, que por sua vez gerou um resultado satisfatório. Foi observado o crescimento de mais de 100 colônias de bactérias transformadas, sendo que não houve crescimento bacteriano na placa de controle negativo, feito com bactérias competentes não transformadas.

Foram coletadas seis colônias para o teste da triagem por PCR. A reação foi feita com os iniciadores específicos VSV F/R como descrito no item 5.5. Como pode ser visto na

FIGURA 11 a seguir, todas as colônias coletadas foram positivas para o inserto de 227 pb do VSV.

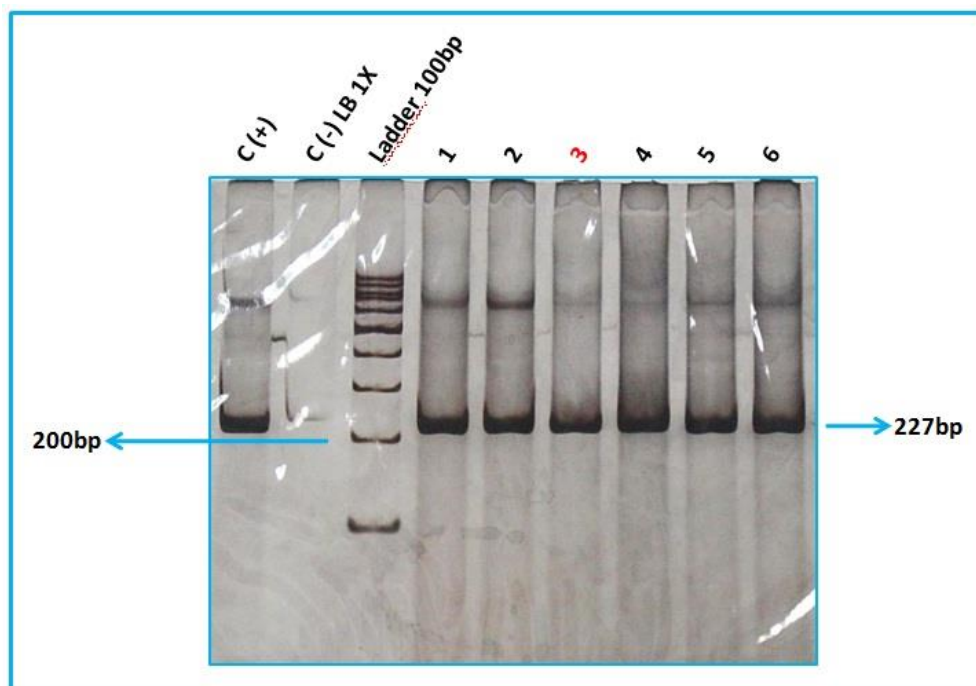


Figura 11. Resultado da triagem das colônias em gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. C(+): cDNA de VSV; C(-): meio LB 1X; *Ladder* 100pb: padrão de tamanho molecular; 1-6: colônias testadas (em vermelho a colônia escolhida para a obtenção do DNA plasmidial).

6.6. Obtenção de DNA plasmidial em pequena escala

Após a obtenção das colônias positivas para o inserto do VSV, foi feita a extração em pequena escala do DNA plasmidial, como descrito de forma detalhada no item 5.9. O volume do produto final obtido foi de 100 μ L e a dosagem no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop Technologies) mostrou uma quantidade total de DNA igual a 204 ng/ μ L.

6.7. Sequenciamento e análise das sequências

O DNA plasmidial obtido anteriormente foi utilizado para o sequenciamento, que foi feito utilizando os iniciadores universais do tipo M13. O fragmento foi sequenciado seis vezes, e um consenso foi feito utilizando a plataforma online Asparagin-Cenargen (genoma.embrapa.br/phph/). Uma sequência consenso de alta qualidade foi obtida e analisada utilizando o programa BLASTn.

A sequência de nucleotídeos do inserto do plasmídeo mostra um perfeito alinhamento com a amostra protótipo de VSV utilizada (J02428), sem nenhuma inserção, deleção ou alteração de elementos (FIGURA 12).

```

>gb|J02428.1|VSVCG Vesicular stomatitis Indiana virus, complete genome
Length=11161

Score = 420 bits (227), Expect = 2e-114
Identities = 227/227 (100%), Gaps = 0/227 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TGATACAGTACAATTATTTTGGGACATTTGCTAGACTCTTGTGATGATGCATGATCCTG 60
            |||
Sbjct 7230    TGATACAGTACAATTATTTTGGGACATTTGCTAGACTCTTGTGATGATGCATGATCCTG 7289

Query 61     CTCCTTCGTC AATCATTGATGAAGTTCAAGATAAGATACCGGGCTTGCACAGTTCTACTT 120
            |||
Sbjct 7290    CTCCTTCGTC AATCATTGATGAAGTTCAAGATAAGATACCGGGCTTGCACAGTTCTACTT 7349

Query 121    TCAAATACGCCATGTTGTATTTGGACCCTTCCATTGGAGGAGTGTCCGGGCATGCTTTTGT 180
            |||
Sbjct 7350    TCAAATACGCCATGTTGTATTTGGACCCTTCCATTGGAGGAGTGTCCGGGCATGCTTTTGT 7409

Query 181    CCAGGTTTTT GATTAGAGCCTTCCCAGATCCCGTAACAGAAAAGTCTC 227
            |||
Sbjct 7410    CCAGGTTTTT GATTAGAGCCTTCCCAGATCCCGTAACAGAAAAGTCTC 7456
  
```

Figura 12. Alinhamento da sequência obtida. Identidade de 100% com o fragmento correspondente da amostra VSV J02428. O alinhamento foi feito utilizando-se o programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

6.8. qPCR

6.8.1. Iniciadores

Todas as características relacionadas aos iniciadores foram analisadas de forma criteriosa. As informações relevantes estão contidas na TABELA 3 e outros dados importantes foram obtidos a partir de buscas de similaridade no GenBank através do programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). A FIGURA 6 a seguir mostra o alinhamento das sequências utilizadas para a confecção dos iniciadores.

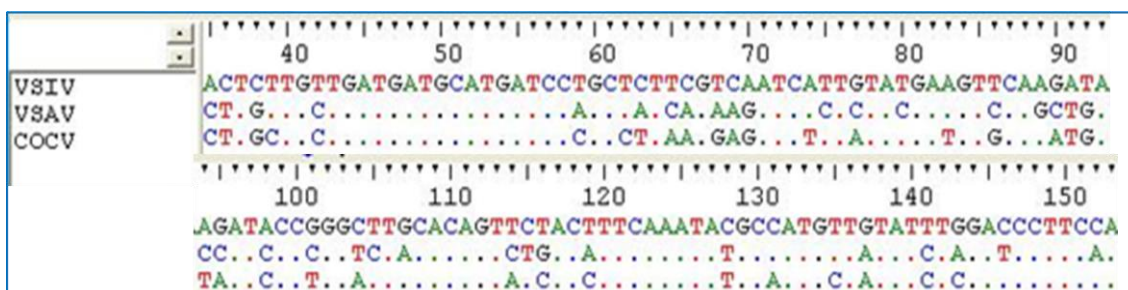


Figura 13. Alinhamento de parte das sequências do VSIV (J02428), VSAV (EU373658) e COCV (EU373657). Imagem extraída do programa BioEdit (HALL, 1999).

Como se pode ver pela FIGURA 13, as sequências apresentam muitas diferenças, apesar de serem pertencentes a amostras de mesmo sorotipo. Regiões onde havia maior similaridade entre as sequências foram escolhidas para desenho dos iniciadores, para permitir um pareamento eficiente e consequente amplificação de todas elas.

Após o desenho dos iniciadores, foi feito um estudo das características gerais dos mesmos através do programa Oligo Calc (KIBBE, 2007), para certificar-se do cumprimento de requisitos básicos para os iniciadores utilizados em qPCR (TABELA 4).

Tabela 4: Relação dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para o VSV.

Iniciador	Sequência	Tamanho (nt)	Conteúdo GC (%)	T _m (°C)	Fragmento (pb)
VSV RT F	5'-GCTGCTGATGATGCATGATC-3'	20	50	58,4	115
VSV RT R	5'-GAAGGGTCCAGATACAACATGG-3'	22	50	62,1	

Além dos dados apresentados na TABELA 4, os iniciadores foram verificados quanto à formação de dímeros (pareamento mínimo de cinco bases) e de alças (pareamento mínimo de quatro bases) através do mesmo programa (Oligo Calc), o que não foi observado para nenhum dos iniciadores.

As sequências dos iniciadores foram comparadas com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Essa análise demonstrou que os iniciadores são capazes de reconhecer de forma eficiente as três amostras utilizadas como molde. Importante lembrar que nenhum outro pareamento importante, não relacionado ao VSV, foi encontrado nessa análise.

Os iniciadores VSV RT F/R apresentaram especificidade para as sequências do VSV e suas amostras naturais (VSAV e COCV), e não apresentaram pareamento importante com sequências pertencentes ao *Vaccinia virus*, *Orf virus*, *Bovine viral diarrhea virus 1*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2*, *Bovine herpesvirus 5* e *Bluetongue virus* (dados não apresentados). Os iniciadores também foram testados com sequências de *Bos taurus*, tendo em vista a origem das amostras clínicas. Nesses casos, foram detectados pareamentos de pequena importância como: na porção 5' dos iniciadores ou envolvendo um pequeno número de bases (menos de 8 nt). Pareamentos com essas

características possuem valores de T_m ($^{\circ}\text{C}$) baixos, que não resultam em amplificação significativa para a PCR.

6.8.1.1. Gradiente de temperatura para os iniciadores VSV RT F e VSV RT R

O teste de gradiente de temperatura foi útil na avaliação da funcionalidade dos iniciadores desenhados em várias temperaturas. O resultado pode ser visto a seguir na FIGURA 14.

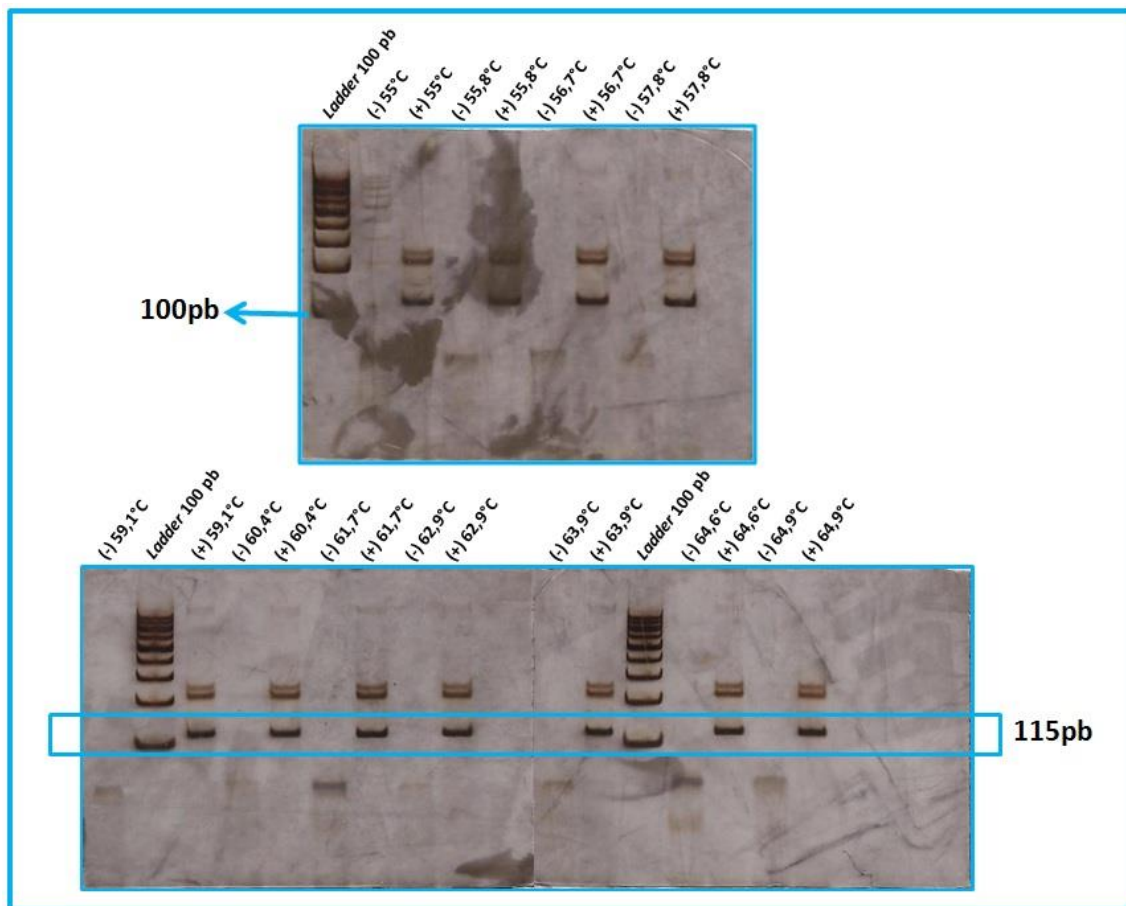


Figura 14. Resultado do teste de gradiente de temperatura em gel de poliacrilamida a 8% corado com prata. *Ladder* 100pb: padrão de tamanho molecular; (-): controles negativos (H_2O); (+): controles positivos (pVSV 15.8 - 50,0 ng).

Pela FIGURA 14 acima é possível observar que os iniciadores funcionaram de forma eficiente em todas as temperaturas testadas. A temperatura de pareamento escolhida para o qPCR foi a de 60°C e o teste nas temperaturas mais próximas ($59,1$ e $60,4^{\circ}\text{C}$) mostrou não haver problemas em utilizar essa temperatura.

6.8.1.2. Teste da qPCR com os iniciadores VSV RT F e VSV RT R – mix caseiro

Foi feita uma qPCR para avaliar a funcionalidade dos iniciadores com essa metodologia. Os resultados obtidos dessa reação encontram-se englobados na FIGURA 15.

Em alguns casos, como o da FIGURA 15, as curvas de amplificação aparecem na forma linear. Isso se deve ao fato de que, no início dos trabalhos com qPCR, o ROX não estava disponível e as curvas logarítmicas ficavam mais difíceis de analisar. No presente trabalho, as figuras apresentam curvas logarítmicas ou lineares de acordo com a facilidade de análise das mesmas, apesar da curva logarítmica ser mais adequada para resultados de qPCR.

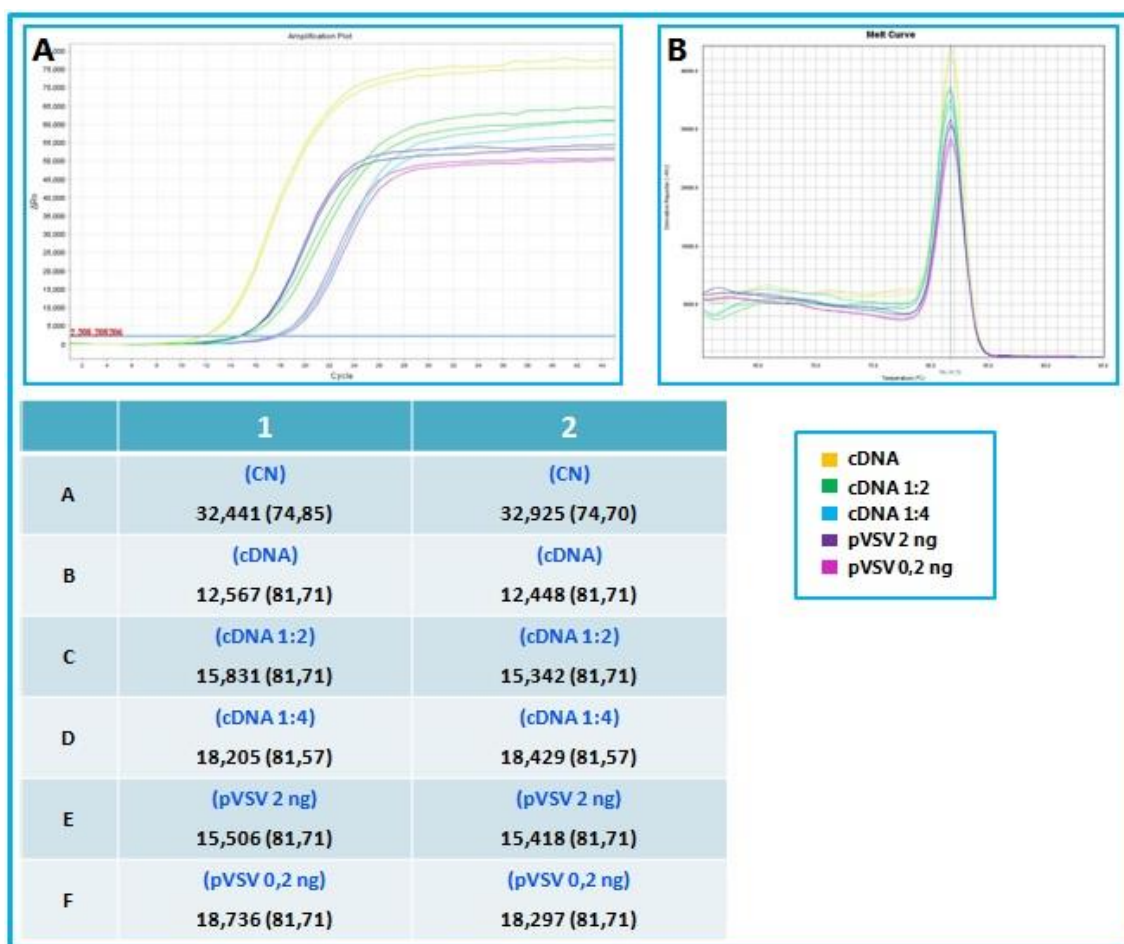


Figura 15. Resultado do teste da qPCR com os iniciadores VSV RT F e VSV RT R. A) Curvas de amplificação específica em escala linear; B) Curvas de dissociação dos fragmentos específicos; Parte inferior: Quadro com o Ct correspondente a cada amostra e o respectivo valor de Tm (°C) entre parênteses.

Como especificado no item 5.12.3, a reação foi feita de maneira arbitrária com relação às quantidades de reagentes, mas o objetivo era somente o de testar a amplificação utilizando os iniciadores desenhados. Além disso, a reação foi feita com mix caseiro, e como amostras foram utilizados o cDNA e o plasmídio controle de VSV (pVSV 15.8). É importante lembrar que não houve diferença significativa nos valores de T_m para as amostras amplificadas. Houve amplificação inespecífica (T_m diferente das amostras) no controle negativo da reação, o que poderia ser minimizado ou abolido através da padronização da reação.

A reação apresenta uma eficiência diferente na amplificação do plasmídio em comparação com o cDNA (FIGURA 15). Nota-se que uma diluição de duas vezes do cDNA acarreta em um aumento de aproximadamente 3Ct, enquanto que a mesma diferença é observada quando se dilui o plasmídio em uma ordem de dez vezes. O resultado é útil para demonstrar que o plasmídio é mais adequado para ser utilizado como controle positivo da reação.

6.8.2. Teste de sensibilidade utilizando mix comercial

O mix comercial (SYBR Green® PCR Master Mix, Applied Biosystems) foi utilizado como uma referência padrão para o teste de sensibilidade com os iniciadores desenhados (VSV RT F/R) e o plasmídio controle de VSV (pVSV 15.8). O resultado global do experimento pode ser visto na FIGURA 16 a seguir.

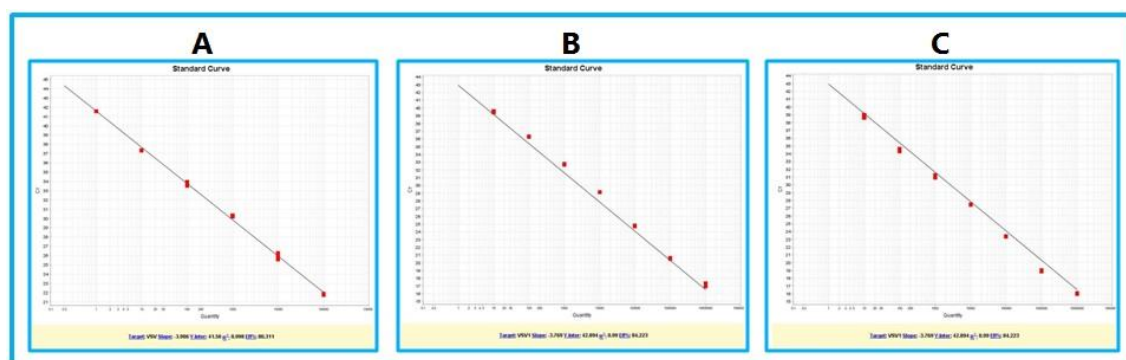


Figura 16. Resultado do teste de sensibilidade utilizando mix comercial. A) Curva padrão estabelecida com a utilização de 100 nM de cada iniciador; Parâmetros: Inclinação: -3.906; R^2 : 0.998; Eficiência: 80.31%; Interseção (eixo Y): 41.56; B) Curva padrão estabelecida com a utilização de 200 nM de cada iniciador; Parâmetros: Inclinação: -3.769; R^2 : 0.99; Eficiência: 84.22%; Interseção (eixo Y): 42.89; C) Curva padrão estabelecida com a utilização de 400 nM de cada iniciador; Parâmetros: Inclinação: -3.808; R^2 : 0.998; Eficiência: 83.06%; Interseção (eixo Y): 44.75.

O teste de sensibilidade com o mix comercial serve como padrão de referência para a reação com o mix caseiro proposta no presente trabalho. A curva foi estabelecida utilizando a quantidade de DNA total do plasmídeo pVSV 15.8, sendo feitas diluições seriadas na base dez. O mix comercial não foi capaz de amplificar o último ponto testado (1,0 fg/ μ L) com eficiência adequada em todos os ensaios, portanto ele não faz parte da curva padrão, pois a reação não apresenta linearidade nesse ponto (FIGURA 16).

O mix comercial foi testado com três diferentes concentrações de iniciadores (100, 200 e 400 nM de cada iniciador) para o estabelecimento da curva padrão. Há uma diferença entre os gráficos da FIGURA 16, já que o gráfico da letra A foi feito com amostras em triplicata e com o ponto de 1,0 ng de DNA como o ponto mais concentrado. Os gráficos B e C foram feitos com amostras em duplicata e com 10,0 ng de DNA como o ponto mais concentrado. A sensibilidade estabelecida nos três gráficos foi a de 10,0 fg de DNA (FIGURA 16).

Os gráficos podem ser comparados entre si, e o melhor resultado foi obtido com o mix da curva B (FIGURA 16), utilizando 200 nM de iniciadores. É o gráfico com a melhor inclinação da curva (-3.769) e também a melhor eficiência (84.22%), sendo esses dados fornecidos pelo equipamento. O gráfico servirá de padrão de comparação com o mix caseiro, mas ainda não apresenta uma eficiência ideal (90-110%).

6.9. Padronização do qPCR

6.9.1. Preparação de um pré-mix caseiro

A padronização do método passou por vários aprimoramentos até chegar a resultados mais concretos. O objetivo era o de conseguir um teste com um nível de reprodutibilidade aceitável. A alta sensibilidade da qPCR pode explicar o grande número de variações observadas em determinados momentos, que podem surgir em virtude de erros de pipetagem e da falta de homogeneidade de reagentes. Esses fatores se tornam ainda mais importantes quando se trata de um mix produzido dentro do laboratório.

Para a padronização do qPCR, foram feitos vários testes quantitativos e qualitativos em relação aos componentes do mix, e o conjunto de etapas descritas a seguir apresentaram

os melhores resultados. A primeira etapa de padronização do teste foi a preparação de um pré-mix caseiro, como descrito no item 5.12.5.

Tampão 10X	1 mL
Evagreen 10X	0,5 mL
H ₂ O	0,5 mL
V _{final}	0,5 mL

O mix foi validado por meio de algumas reações cujos resultados estão representados na FIGURA 17. O frequente aparecimento de amplificação inespecífica no controle negativo da qPCR obrigou a realização de alguns testes adicionais, como o uso de uma *Taq* DNA polimerase comercial na reação.

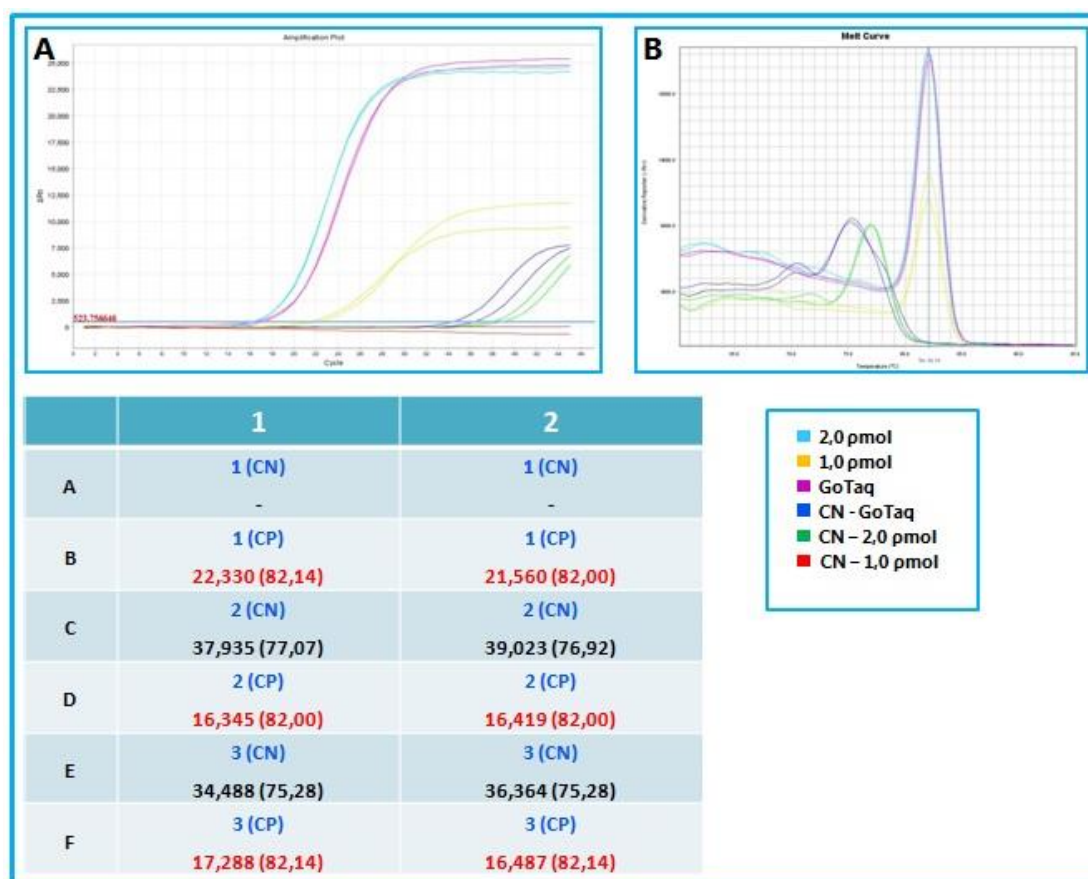


Figura 17. Resultado do teste do pré-mix caseiro. A) Curvas de amplificação em escala linear; B) Curvas de dissociação dos fragmentos amplificados; **Parte inferior:** Quadro com o Ct correspondente a cada amostra e o respectivo valor de T_m (°C) entre parênteses. Os valores em azul representam cada mix em questão, sendo 1: reação com 1,0 μ mol/100 μ L de cada iniciador; 2: reação com 2,0 μ mol/100 μ L de cada iniciador; 3: reação com 2,0 μ mol/100 μ L de cada iniciador e GoTaq Promega®. CN: controle negativo; CP: controle positivo. (-): indica ausência de amplificação.

Com base nesses resultados, pode-se concluir que o mix caseiro foi validado com sucesso, tendo em vista as ampliações específicas do controle positivo em todas as reações. O experimento também foi útil para demonstrar a importância da padronização do teste, pois uma simples mudança na concentração de iniciadores pode gerar um perfil de reação diferente. Os resultados demonstram certa instabilidade do mix, que apresenta grandes variações a partir de pequenas mudanças (FIGURA 17).

A utilização da *Taq* DNA polimerase comercial (Go*Taq* Promega®) foi útil ao demonstrar que a amplificação inespecífica obtida nos controles negativos dos mix 2 e 3 não era uma característica intrínseca ao uso da *Taq* DNA polimerase do Laboratório de Vírus – ICB/UFMG, que é produzida por tecnologia de DNA recombinante e passa por menos etapas de purificação em comparação com enzimas comerciais (FIGURA 17). Esse tipo de amplificação pode ser oriundo da dimerização dos iniciadores, tendo em vista que: ocorre somente no controle negativo da reação; desaparece com a diminuição da concentração dos iniciadores; possui um valor de T_m baixo (INVITROGEN, 2008). Em todas as etapas de padronização subsequentes, os parâmetros foram selecionados com o objetivo de minimizar ao máximo o aparecimento da amplificação inespecífica no controle negativo, sem prejuízos à sensibilidade da reação.

Outro fato importante é que entre os mix 2 e 3 da FIGURA 17 não houve diferença significativa na detecção dos controles positivos, demonstrando que as enzimas não modificaram a eficiência da reação.

Nessa etapa é possível notar que, de uma maneira geral, o T_m da amplificação específica obtido com o mix comercial ($\sim 76.5^\circ\text{C}$) (FIGURA 16) é menor que o T_m obtido com o mix caseiro ($\sim 81.5^\circ\text{C}$) (FIGURAS 15 e 17).

6.9.2. Padronização – Curva de iniciadores

Como primeira etapa de padronização de reagentes do mix, foi feita uma curva de concentração de iniciadores, a fim de encontrar o valor mais adequado para o sistema proposto. O experimento foi detalhado no item 5.12.6 e os resultados estão compreendidos na FIGURA 18 a seguir.

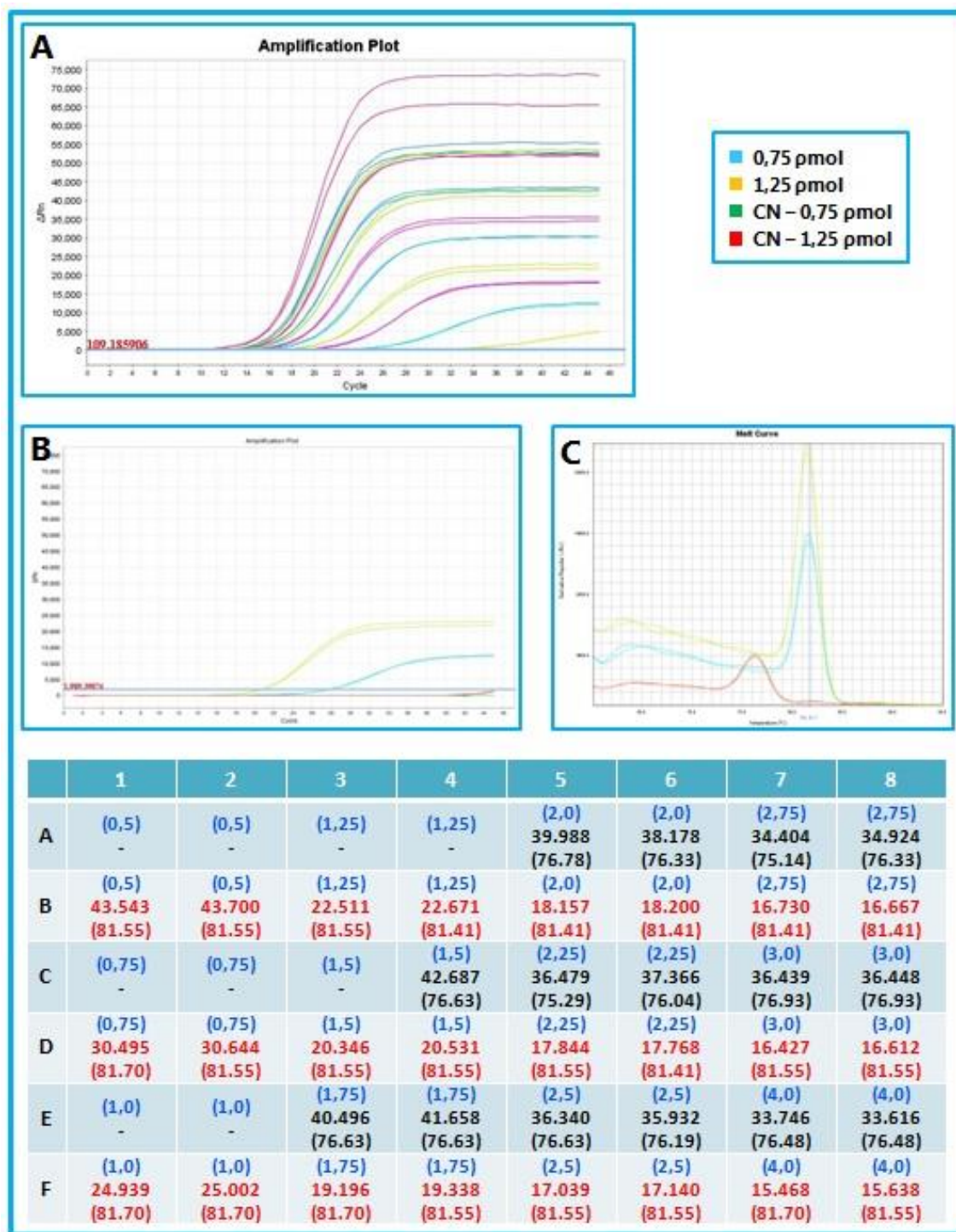


Figura 18. Resultado da curva de concentração de iniciadores. A) Curvas de amplificação em escala linear de todas as reações com controle positivo; B) Curvas de amplificação em escala linear das reações com 0,75 e 1,25 pmol/100 μ L de cada iniciador; C) Curvas de dissociação das reações com 0,75 e 1,25 pmol/100 μ L de cada iniciador; **Parte inferior:** Quadro com o Ct correspondente a cada reação e o respectivo valor de Tm ($^{\circ}$ C) entre parênteses. Os valores em azul indicam a concentração de cada iniciador em pmol/100 μ L. Os valores em vermelho correspondem aos controles positivos (Linhas B, D e F) e em preto os controles negativos (Linhas A, C e E). (-): indica ausência de amplificação.

A curva de iniciadores foi testada com concentrações que variaram de 0,5 a 4,0 $\mu\text{mol}/100\ \mu\text{L}$ de cada iniciador, mantendo-se as seguintes concentrações dos outros reagentes: MgCl_2 a 1,5 mM e dNTP a 25 μM .

Foram escolhidas para a etapa subsequente duas concentrações de iniciadores: 0,75 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$ (Mix 2) e 1,25 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$ (Mix 4). As duas foram escolhidas pela mínima amplificação inespecífica no controle negativo e pela eficiência na detecção do controle positivo, quando comparado com as concentrações mais baixas. A amplificação do Mix 2 para o controle positivo não foi tão eficiente ($C_t \sim 30.5$), mas poderia melhorar significativamente em etapas seguintes de padronização. O C_t encontrado para o Mix 4 (~ 22.5) (FIGURA 18) se assemelha ao valor obtido da amplificação do primeiro ponto da curva padrão (1,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de DNA) com o mix comercial (~ 22.4), como pode ser visto na FIGURA 16, sendo o mix comercial um padrão de referência.

Houve um ganho de sensibilidade nas concentrações mais altas de iniciadores, mas isso era sempre acompanhado das amplificações inespecíficas (FIGURA 18). O objetivo foi o de padronizar a reação ausente de amplificação inespecífica no controle negativo, o que justifica a escolha das concentrações citadas acima.

6.9.3. Padronização – Curva de MgCl_2

Essa etapa da padronização teve como objetivo a determinação da concentração ideal de iniciadores em conjunto com o MgCl_2 , tendo em vista que foram feitas duas curvas de MgCl_2 . Resumidamente, foram testadas concentrações de MgCl_2 que variaram de 0,5 a 3,0 mM, mantendo-se a concentração de dNTP (25 μM) e duas concentrações de iniciadores (0,75 e 1,25 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$). Os procedimentos foram detalhados no item 5.12.7 e os resultados estão contidos nas FIGURAS 19 e 20.

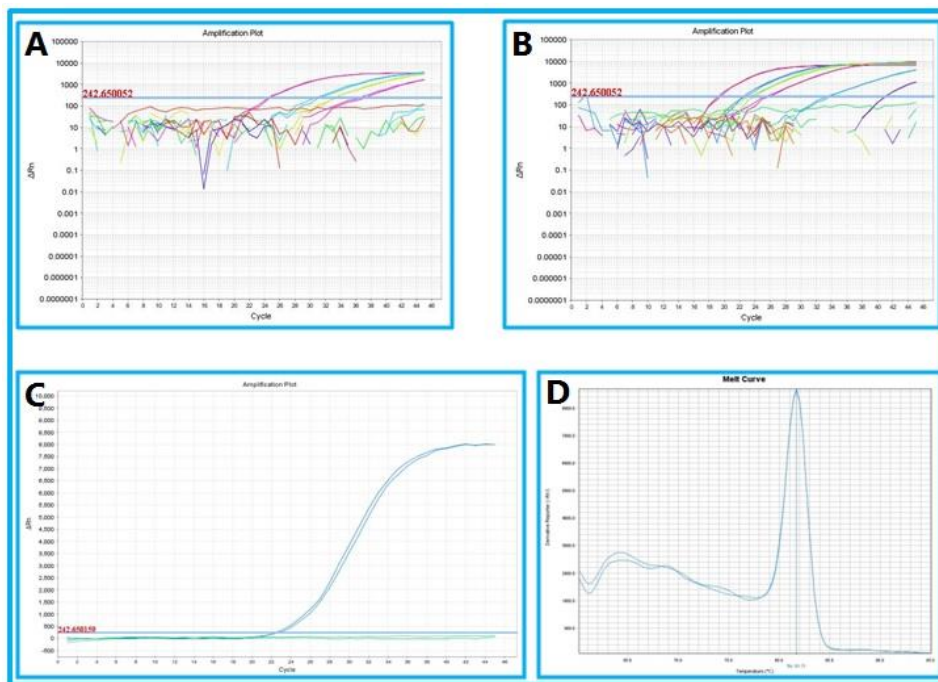


Figura 19. Resultado da curva de concentração de MgCl₂. A) Curvas de amplificação em escala logarítmica das reações com 0,75 µmol/100µL de cada iniciador; B) Curvas de amplificação em escala logarítmica das reações com 1,25 µmol/100µL de cada iniciador; C) Curvas de amplificação em escala linear da reação com 2,0 mM de MgCl₂ e 1,25 µmol/100µL de cada iniciador; D) Curvas de dissociação da reação com 2,0 mM de MgCl₂ e 1,25 µmol/100µL de cada iniciador.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	(0,5)	(0,5)	(1,8)	(1,8)	(0,5)	(0,5)	(1,8)	(1,8)
	-	-	-	-	-	-	-	-
B	(0,5)	(0,5)	(1,8)	(1,8)	(0,5)	(0,5)	(1,8)	(1,8)
	-	-	33.308	33.372	-	-	23.298	23.925
			(81.85)	(81.71)			(81.56)	(81.56)
C	(1,0)	(1,0)	(2,0)	(2,0)	(1,0)	(1,0)	(2,0)	(2,0)
	-	-	-	-	-	-	-	-
D	(1,0)	(1,0)	(2,0)	(2,0)	(1,0)	(1,0)	(2,0)	(2,0)
	-	-	30.867	31.311	33.818	33.496	22.839	22.480
			(81.85)	(81.85)	(81.26)	(81.26)	(81.71)	(81.71)
E	(1,5)	(1,5)	(3,0)	(3,0)	(1,5)	(1,5)	(3,0)	(3,0)
	-	-	-	-	-	-	41.045	41.012
							(76.63)	(76.63)
F	(1,5)	(1,5)	(3,0)	(3,0)	(1,5)	(1,5)	(3,0)	(3,0)
	36.347	37.233	24.724	24.543	25.948	25.516	19.339	19.155
	(81.85)	(81.85)	(82.15)	(82.00)	(81.56)	(81.56)	(82.00)	(82.00)

Figura 20. Quadro com os resultados da curva de concentração de MgCl₂. Valores de Ct correspondentes a cada reação e o respectivo valor de T_m (°C) entre parênteses. Os valores em azul indicam a concentração de MgCl₂ em mM. Os valores em vermelho indicam os controles positivos (Linhas B, D e F) e em preto os controles negativos (Linhas A, C e E). Colunas 1-4: utilização de 0,75 µmol/100µL de cada iniciador; Colunas 5-8 utilização de 1,25 µmol/100µL de cada iniciador. (-): indica ausência de amplificação.

Como pode ser visto nas figuras (FIGURA 19 e 20), o índice de ampliações inespecíficas nos controles negativos foi bem menor em relação às etapas anteriores, mostrando a importância da padronização dos reagentes da PCR. A reação não foi muito eficiente com a utilização de 0,75 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ de iniciadores quando comparada à concentração de 1,25 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$. Mesmo com a utilização de 3,0 mM de MgCl_2 o C_t ainda permaneceu alto (~ 24.6).

O uso de uma concentração maior de iniciadores acarretou num melhor perfil de amplificação, sendo mais sensível (FIGURA 19 e 20). Nesse caso, a concentração de iniciadores mais adequada foi a de 1,25 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ e a de MgCl_2 foi a de 2,0 mM. Com esses parâmetros a reação se apresentou bastante sensível, com um C_t médio de 22,660, e ausência de amplificação inespecífica no controle negativo (FIGURA 19 e 20).

É observada uma variação no T_m das ampliações específicas nas diferentes reações, o que pode ser explicado pela diferente concentração de sal, nesse caso, principalmente o MgCl_2 .

6.9.4. Padronização – Curva de dNTP

Após a definição da concentração adequada de iniciadores (1,25 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$) e MgCl_2 (2,0 mM), foi feita uma curva de concentração de dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), com uma variação de 10 a 100 μM . O experimento foi descrito detalhadamente no item 5.12.8 e os resultados são apresentados a seguir (FIGURA 21).

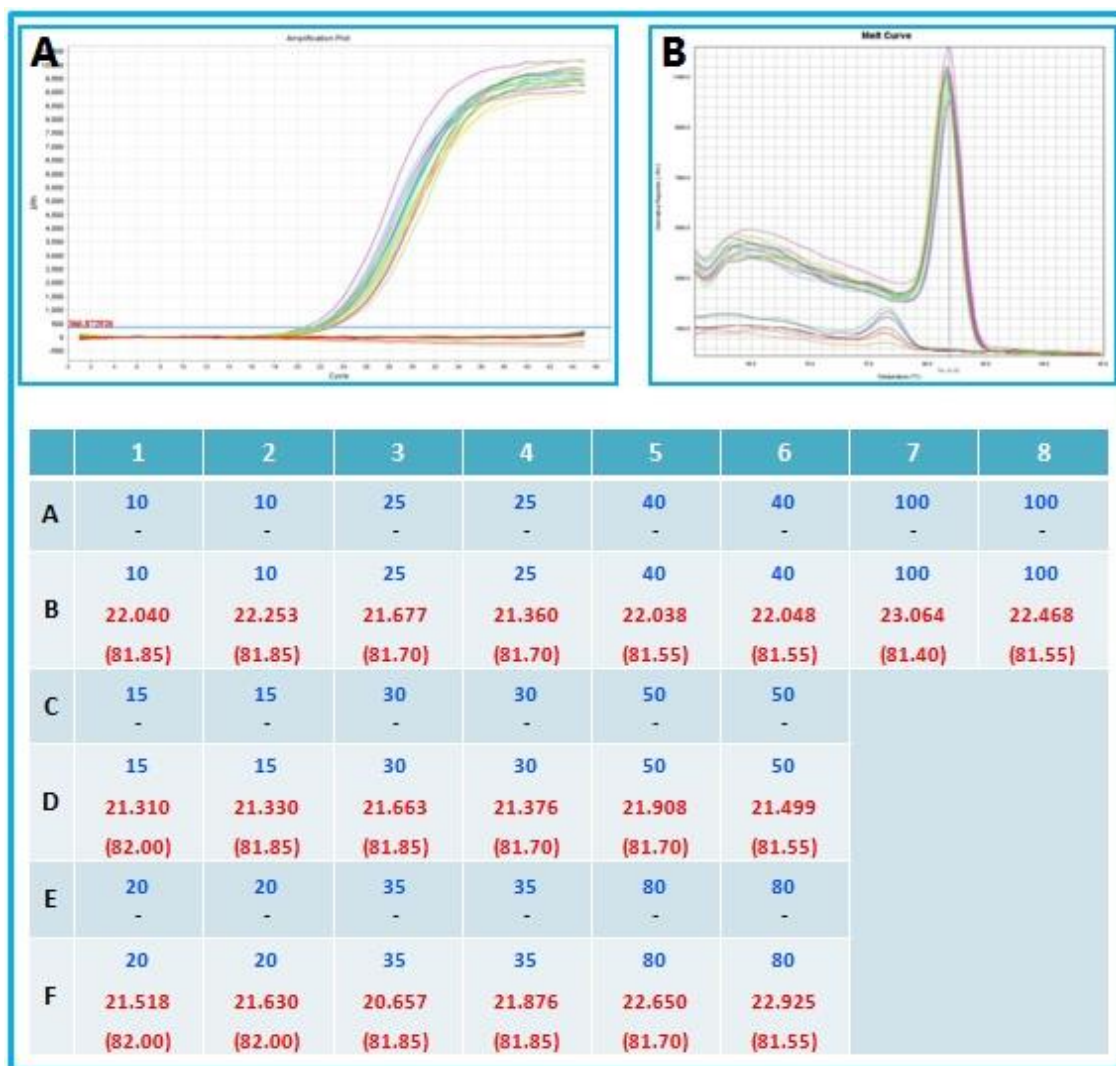


Figura 21. Resultado da curva de concentração de dNTP. A) Curvas de amplificação em escala linear de todas as reações; B) Curvas de dissociação de todas as reações; **Parte inferior:** Quadro com o Ct correspondente a cada reação e o respectivo valor de Tm (°C) entre parênteses. Os valores em azul indicam a concentração de cada dNTP em µM. Os valores em vermelho indicam os controles positivos (Linhas B, D e F); Linhas A, C e E: controles negativos (-): indica ausência de amplificação.

Em relação à curva de dNTP, não foi observada amplificação inespecífica nos controles negativos (Linhas A, C e E no quadro da FIGURA 21). A amplificação dos controles positivos foi pouco variável entre as diferentes reações, sendo 20.657 (Posição F3) o menor Ct e 23.064 (Posição B7) o maior entre eles (FIGURA 21). A variação observada foi pequena, considerando que o dNTP variou de 10 a 100 µM. Como não há um aumento na sensibilidade da reação com o aumento da concentração de dNTP, decidiu-se que a concentração mais adequada para uso foi a de 10 µM de cada dNTP.

6.9.5. Teste de sensibilidade utilizando mix caseiro

Como descrito no item 5.12.9, foi feito o teste de sensibilidade com os parâmetros estabelecidos para a padronização do teste, que consistiram de: 1,25 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ de cada iniciador, 2,0 mM de MgCl_2 e 10 μM de cada dNTP. Os resultados encontram-se agrupados na FIGURA 22 a seguir.

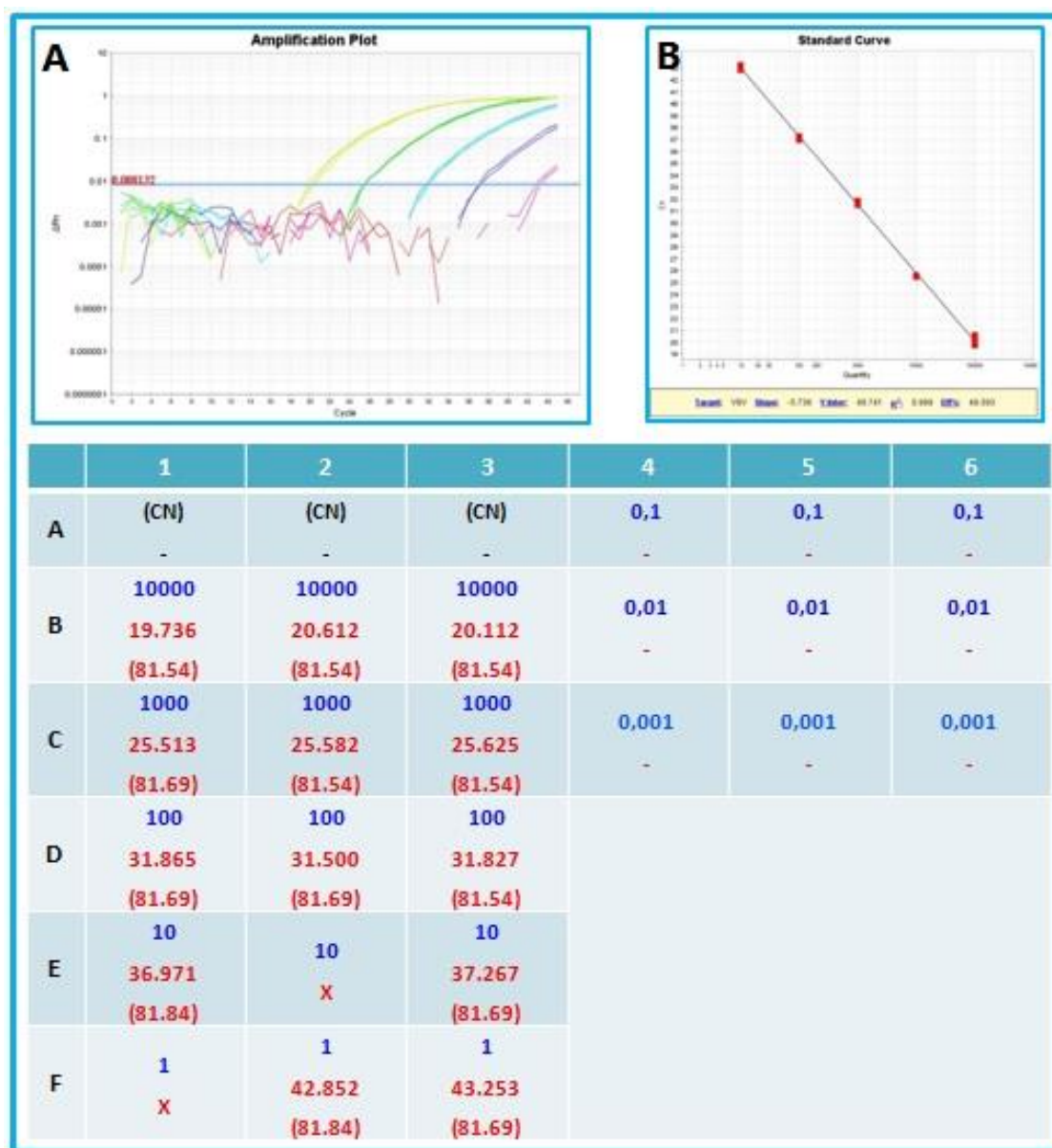


Figura 22. Resultado do teste de sensibilidade utilizando mix caseiro. A) Curvas de amplificação em escala logarítmica; B) Curva padrão obtida; Parâmetros: Inclinação: -5.736, Interseção (eixo Y): 48,74, R^2 : 0,999 e Eficiência: 49,39%. **Parte inferior:** Quadro com o Ct correspondente a cada amostra e o respectivo valor de T_m ($^{\circ}\text{C}$) entre parênteses. Os valores em azul indicam a concentração de DNA (pVSV 15.8) na amostra, em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. CN: controle negativo, X: pontos desconsiderados da curva padrão. (-): indica ausência de amplificação.

A curva observada na FIGURA 22 representa o teste de sensibilidade do mix caseiro padronizado com o plasmídio pVSV 15.8. A curva apresenta um coeficiente de linearidade adequado (0,999), mas uma baixa eficiência (49,39%), o que pode ser visto também na inclinação da curva (-5,736). Como mencionado anteriormente, valores de eficiência devem estar compreendidos entre 90 e 110% e a inclinação da curva deve estar entre -3.58 e -3.10. A reação cumpre com o objetivo de não apresentar amplificação inespecífica no controle negativo, mas perde significativamente em sensibilidade. A sensibilidade alcançada foi de apenas 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo este um valor inadequado para qPCR. Por esse motivo, a reação passou por etapas posteriores de otimização.

6.9.6. Teste de especificidade da reação

Como descrito no item 5.12.10, foram feitos os testes de especificidade da reação, levando em consideração os agentes envolvidos em doenças confundíveis com a estomatite vesicular. A reação foi feita levando em consideração o mix padronizado obtido anteriormente e as amostras foram utilizadas da seguinte maneira: para amostras de vírus com genoma de DNA (*Vaccinia virus*, *Orf virus*, *Bovine herpesvirus 2*, *Bovine herpesvirus 1* e *Bovine herpesvirus 5*) foram utilizados extratos de DNA, enquanto que para os vírus com genoma de RNA (*Bovine viral diarrhea virus 1* e *Bluetongue virus*) foram utilizados os cDNA obtidos a partir de RT com iniciadores randômicos. Para a amostra de *Staphylococcus aureus*, foi utilizada uma diluição de 100 vezes do meio de cultura contendo o microrganismo. Os resultados são apresentados nas FIGURAS 23 e 24.

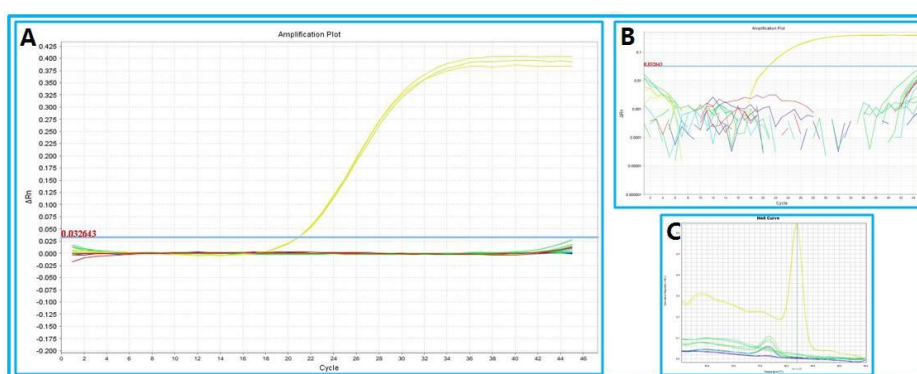


Figura 23. Resultado do teste de especificidade com amostras virais relacionadas. A) Curvas de amplificação em escala linear de todas as reações; B) Curvas de amplificação em escala logarítmica de todas as reações; C) Curvas de dissociação de todas as reações. A curva em amarelo indica a amplificação do controle positivo pVSV 15.8 (1,0 ng).

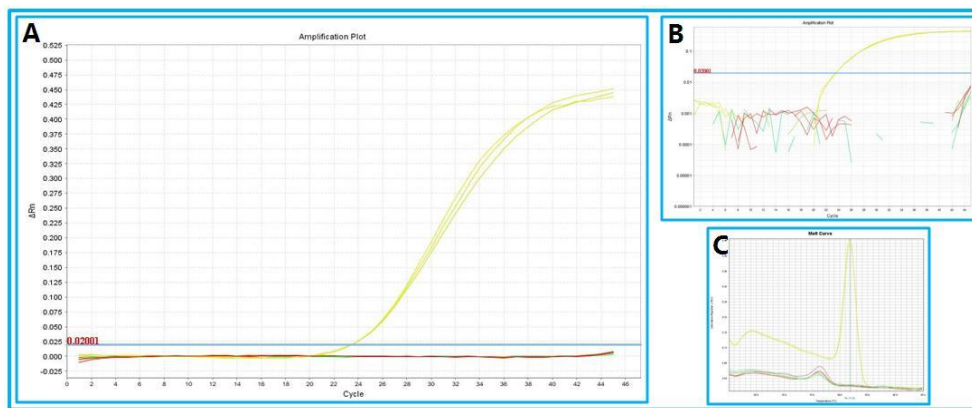


Figura 24. Resultado do teste de especificidade com uma amostra de *Staphylococcus aureus*. A) Curvas de amplificação em escala linear de todas as reações; B) Curvas de amplificação em escala logarítmica de todas as reações; C) Curvas de dissociação de todas as reações. A curva em amarelo indica a amplificação do controle positivo pVSV 15.8 (1,0 ng).

Como pode ser visto nas FIGURAS 23 e 24, não foram observadas amplificações em nenhuma das amostras relacionadas, o que permite a validação do teste de especificidade para as amostras testadas. Importante lembrar que houve amplificação específica no controle positivo (pVSV 15.8) e não houve amplificação no controle negativo da reação (H₂O).

6.10. Teste da RT

Com o objetivo de verificar a eficiência da RT, foram testados alguns protocolos que poderiam ser utilizados. Esses testes se fizeram necessários para aumentar a sensibilidade da qPCR, através da melhora na quantidade e qualidade do cDNA utilizado como amostra. Para isso, foram utilizados alguns protocolos com os seguintes iniciadores: VSV RT F, Oligo dT e iniciadores randômicos. Os resultados encontram-se agrupados na FIGURA 25.

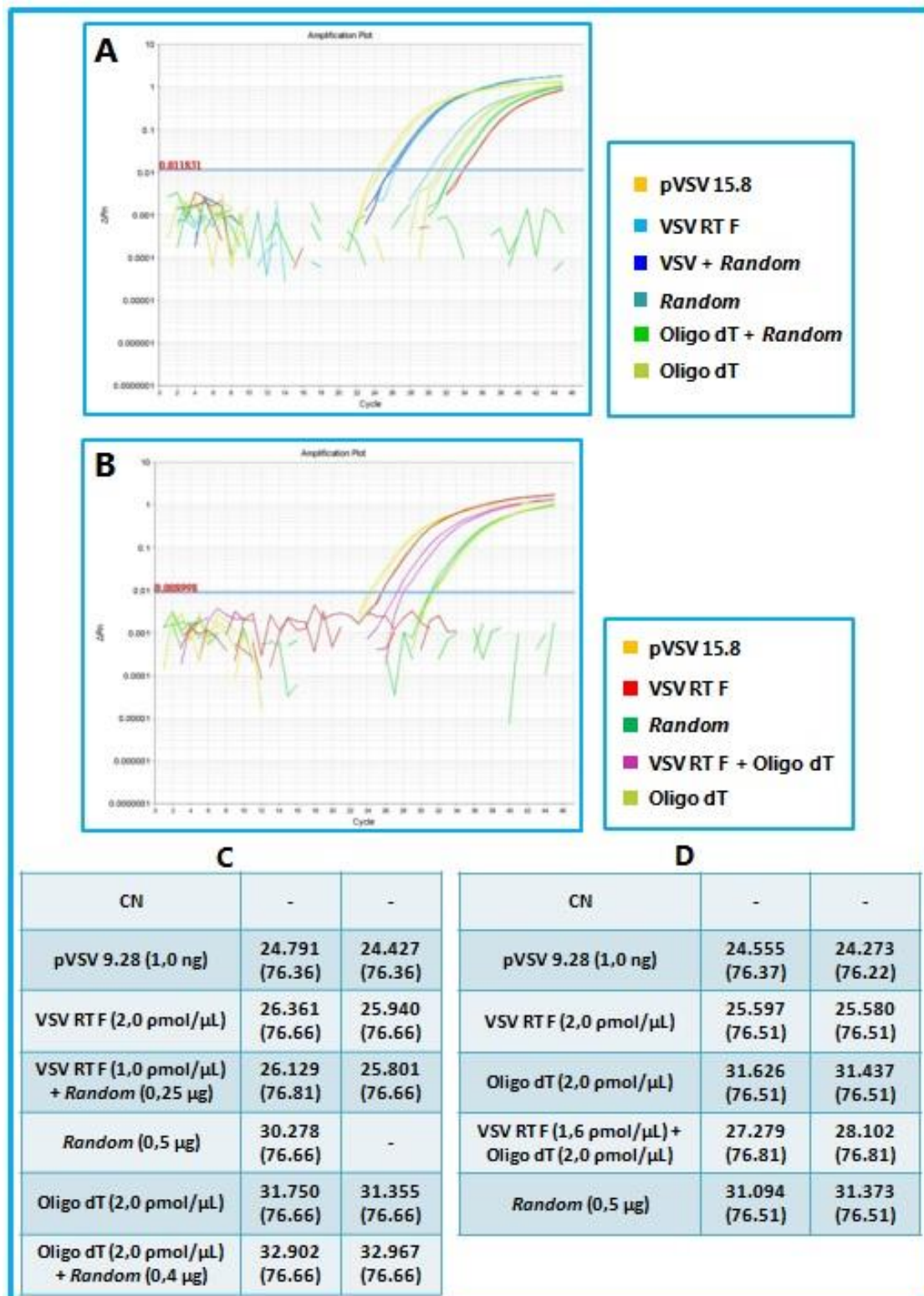


Figura 25. Resultado dos testes da RT. A e B) Curvas de amplificação em escala logarítmica para os testes relacionados na legenda ao lado; C e D) Quadro com o Ct correspondente a cada amostra e o respectivo valor de Tm (°C) entre parênteses. (-): indica ausência de amplificação.

O resultado apresentado na FIGURA 25 ilustra os testes realizados com a RT. Todas as combinações foram feitas para um volume final de reação de 25 μL e o controle

positivo pVSV 15.8 foi utilizado como padrão de comparação com as reações feitas a partir de cDNA. A reação mais eficiente foi obtida com a utilização do iniciador específico do VSV (VSV RT F), resultando em um Ct de aproximadamente 25.5. Os iniciadores randômicos não apresentaram eficiência adequada (Ct~30.5) e quando utilizados de forma combinada não pareciam ser eficazes. Isso pode ser observado na combinação de iniciadores randômicos com Oligo dT ou VSV RT F. A reação combinada apresenta Ct similar à reação feita somente com um destes (FIGURA 25). A ocorrência disso pode ser explicada pela temperatura utilizada nas reações combinadas (42°C), que pode estar elevada para os iniciadores randômicos. A reação foi feita a 37°C apenas na reação do iniciador randômico sozinho.

A reação com Oligo dT parecia promissora, por detectar apenas o RNAm do VSV. A reação poderia ser combinada com o iniciador VSV RT F que detecta apenas o genoma do VSV. A reação com o Oligo dT apenas, possui uma eficiência parecida com a reação dos iniciadores randômicos (Ct~31.5), enquanto a reação com o VSV RT F apresenta maior eficiência (Ct~25.5). Entretanto, a reação com os iniciadores combinados alcançou uma eficiência intermediária (Ct~27.7) (FIGURA 25). Talvez fosse necessária uma padronização da concentração de iniciadores, tendo em vista a possibilidade de competição entre os mesmos. Os resultados apontam a reação com o iniciador VSV RT F como a mais eficiente, sendo indicada para as próximas etapas.

6.11. Curva de iniciadores utilizando amostra clínica

A curva de iniciadores foi feita com o objetivo de otimizar o teste. O procedimento foi detalhado no item 5.12.15 e o resultado pode ser visto na FIGURA 26.

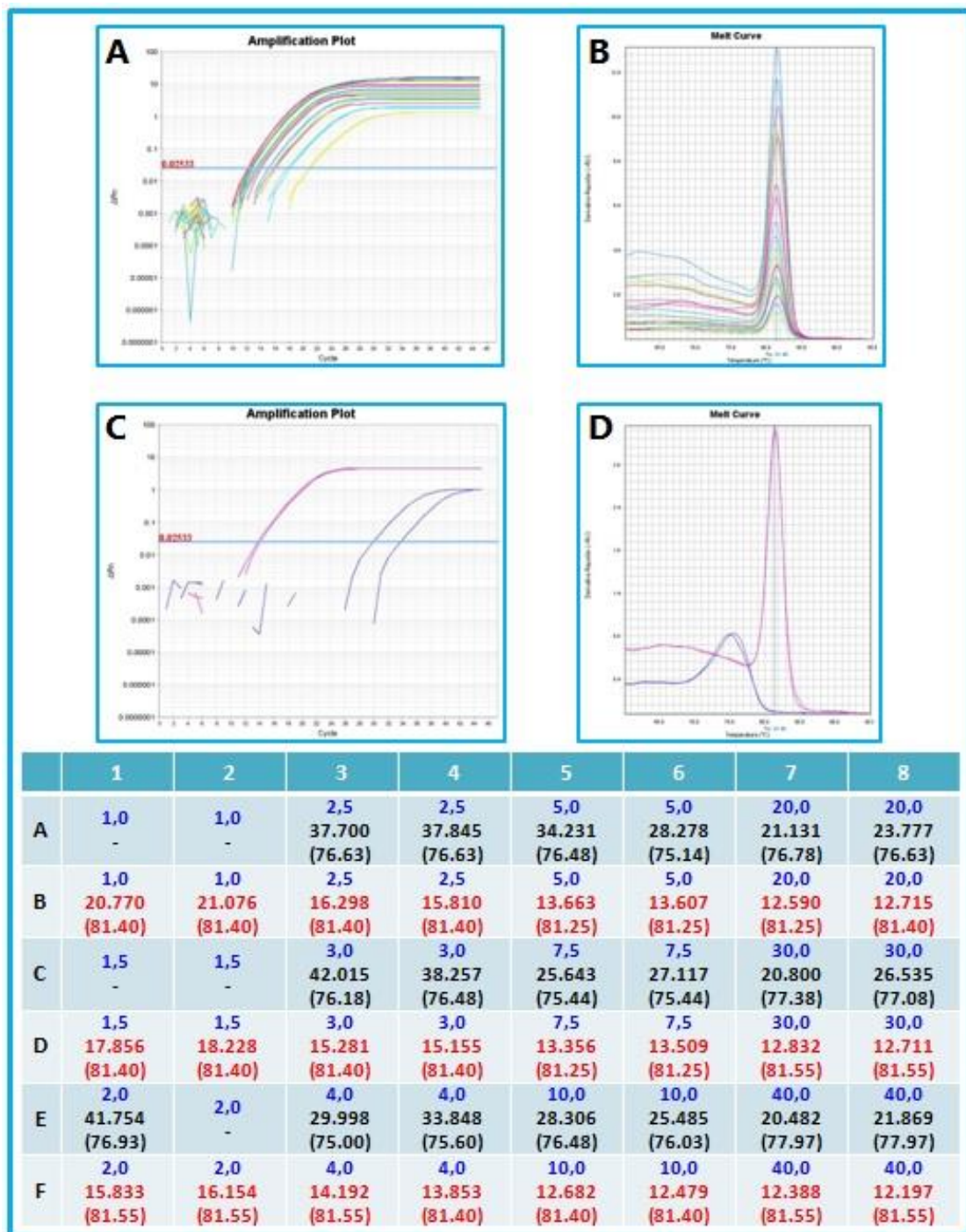


Figura 26. Resultado da otimização da concentração de iniciadores. A) Curvas de amplificação em escala logarítmica de todas as reações com controle positivo; B) Curvas de dissociação de todas as reações com controle positivo; C) Curvas de amplificação em escala logarítmica das reações com 4,0 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$ de cada iniciador; D) Curvas de dissociação das reações com 4,0 $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$ de cada iniciador; **Parte inferior:** Quadro com o Ct correspondente a cada reação e o respectivo valor de Tm ($^{\circ}\text{C}$) entre parênteses. Os valores em azul indicam a concentração de cada iniciador em $\mu\text{mol}/100\mu\text{L}$. Em preto os controles negativos (H_2O) (Linhas A, C e E); Em vermelho as amostras testadas (Linhas B, D e F).

Os resultados apresentados na FIGURA 26 mostram a capacidade da reação em amplificar o material genético do VSV a partir de amostras de origem bovina. A otimização da concentração de iniciadores se fez necessária, já que a eficiência da reação não seria adequada com a utilização da concentração padronizada em 1,25 pmol/100 µL. A reação apresentou um ganho de sensibilidade com o aumento da concentração de iniciadores, mesmo com a presença da amplificação inespecífica no controle negativo. A concentração escolhida na otimização foi a de 4,0 pmol/100 µL de cada iniciador, pois houve um ganho significativo no Ct, observado em aproximadamente 14,0 e manteve a amplificação inespecífica em um nível aceitável, já que foi observada em torno de um Ct igual a 32,0. A otimização se justifica pelo ganho de sensibilidade, tendo em vista que a reação tem o objetivo de diagnóstico.

6.12. Comparação entre amostras tratadas e não tratadas com DNase

O teste especificado no item 5.12.16 foi feito com o objetivo de verificar a necessidade de se utilizar o tratamento com DNase nas amostras. O protocolo testado gerou os resultados apresentados na FIGURA 27.

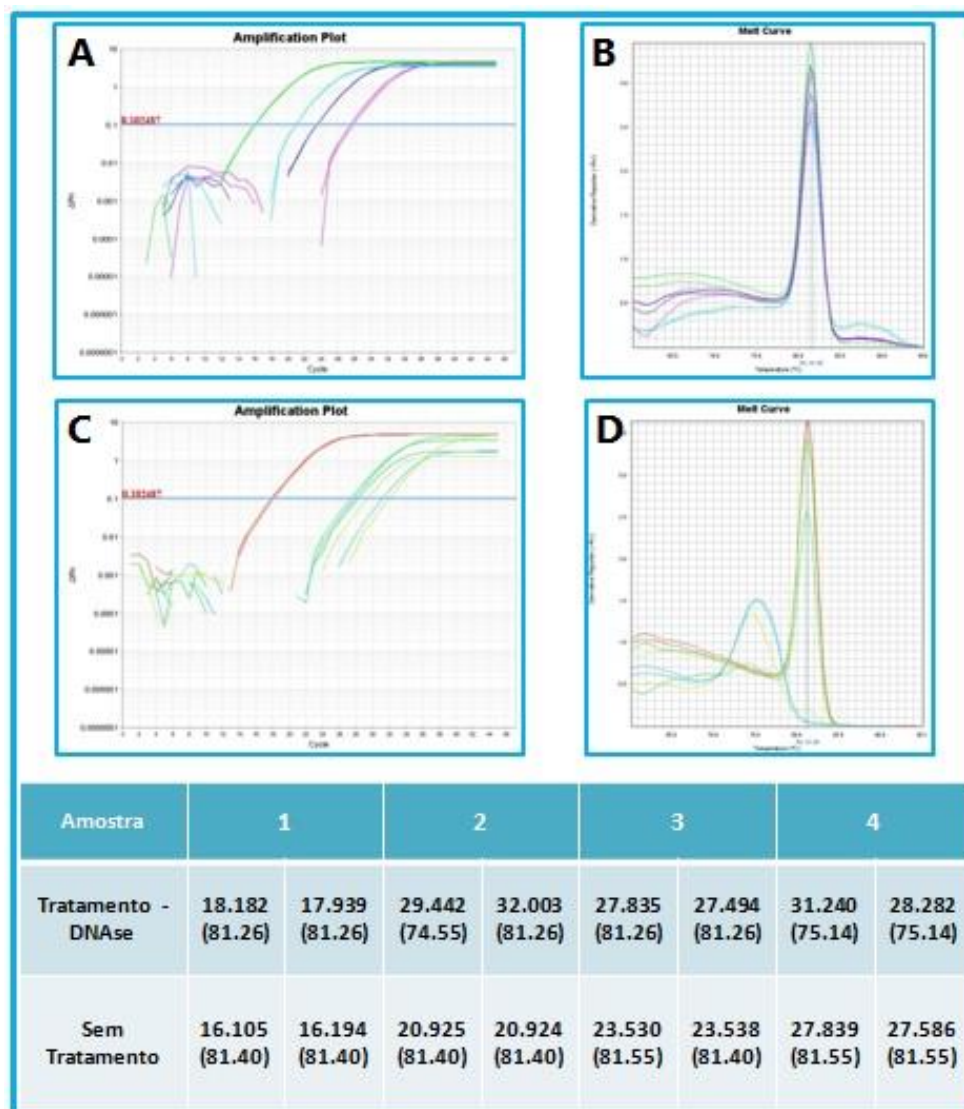


Figura 27. Resultado do teste de tratamento com DNase I. A e B) Curvas de amplificação em escala logarítmica e curvas de dissociação das amostras não tratadas com DNase I; C e D) Curvas de amplificação em escala logarítmica e curvas de dissociação das amostras tratadas com DNase I; Parte inferior: Quadro com o Ct correspondente a cada reação e o respectivo valor de Tm (°C) entre parênteses.

As amostras que aparecem na FIGURA 27 foram obtidas da contaminação deliberada com VSV do item 5.12.11. O título do vírus nesse caso variou de 10^4 a 10^7 PFU.

O resultado da FIGURA 27 demonstra que o uso do protocolo de tratamento com DNase utilizado no presente trabalho não se mostrou eficiente. Como se pode ver pela FIGURA 27, a reação foi progressivamente mais eficiente com as amostras não tratadas em comparação com as amostras tratadas com DNase I. Além disso, algumas reações com as amostras tratadas resultaram em amplificações com Tm (°C) diferentes em relação aos valores obtidos para as amostras não tratadas. O Tm específico do fragmento é aproximadamente 81,5°C e em alguns pontos (amostras tratadas 2 e 4) o

valor obtido foi diferente ($\sim 75^{\circ}\text{C}$). Isso também pode ser visto na figura das curvas de dissociação (FIGURA 27D). Outra característica importante observada foi a falta de repetitividade nos valores de Ct obtidos das duplicatas de amostras tratadas. Os valores das duplicatas das amostras não tratadas foram uniformes, apresentando uma variação normal. Portanto, ficou determinado que o protocolo de tratamento com DNase I utilizado no presente trabalho não seria incluído como etapa do teste.

6.13. qPCR das amostras clínicas

Após a otimização da concentração de iniciadores, seleção do melhor método para a RT e para o tratamento das amostras, foi feito o teste da qPCR para as amostras clínicas. O resultado é apresentado na FIGURA 28 a seguir.

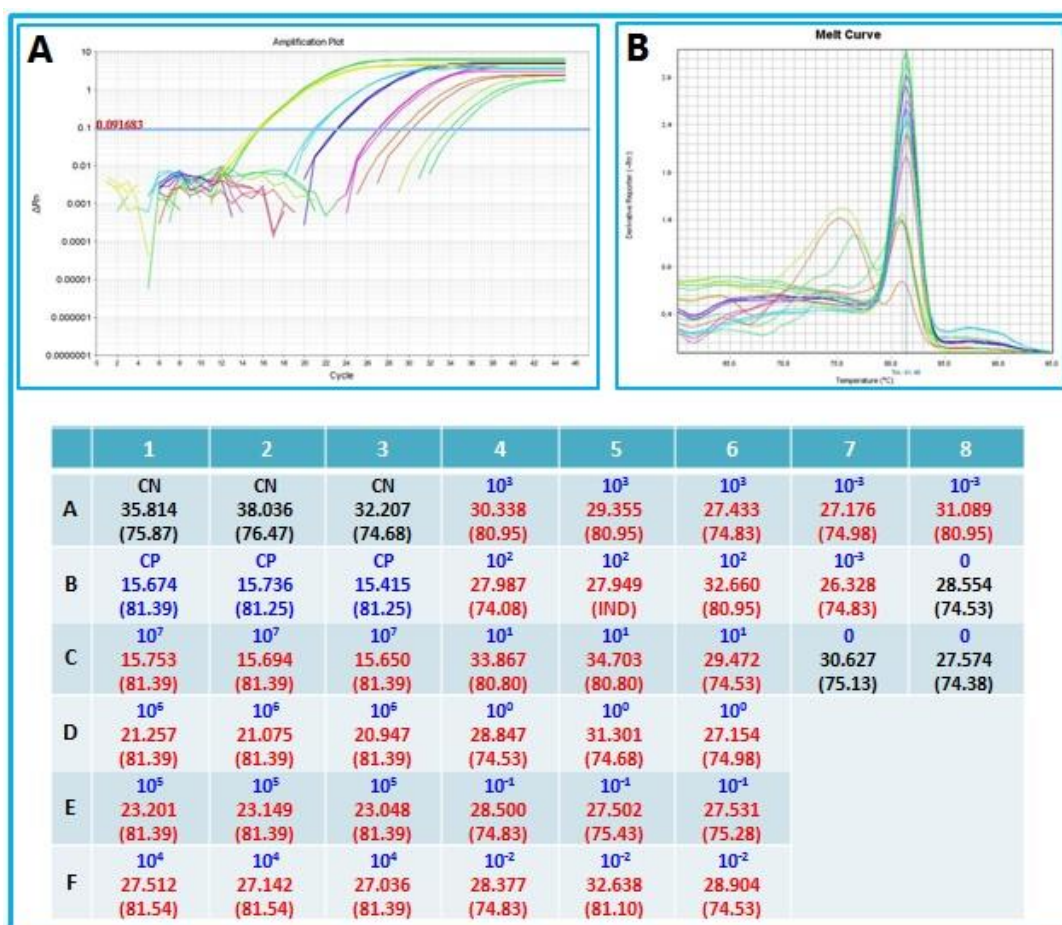


Figura 28. Resultado da qPCR das amostras clínicas. A) Curvas de amplificação em escala logarítmica das reações positivas; B) Curvas de dissociação das reações positivas; **Parte inferior:** Quadro com o Ct correspondente a cada reação e o respectivo valor de Tm ($^{\circ}\text{C}$) entre parênteses. Os valores em azul indicam a quantidade de vírus presente em cada amostra (PFU). CN: controle negativo; CP: controle positivo pVSV 15.8 (1,0 ng). Os valores em vermelho representam as amostras e em preto os controles negativos.

O teste com amostras clínicas visto na FIGURA 28 demonstra que a reação necessita de aprimoramentos. Houve amplificação de material genético até a diluição de 10^1 PFU, mas que não podem ser considerados por completo por causa da amplificação observada nos controles negativos. Considerando-se esse fato, a sensibilidade do teste foi considerada até a diluição de 10^5 PFU, pois a amplificação nesse ponto ocorreu distante das amplificações dos controles negativos (ΔC_t).

O uso de diluições negativas (10^{-1} a 10^{-3} PFU) se justifica pelo fato de que os valores em PFU indicam a quantidade de partículas viáveis a partir de titulação em células Vero, ou seja, pode haver a presença de material genético do vírus mesmo sem a presença de partículas viáveis. A sensibilidade obtida (10^5 PFU) demonstrou que o teste precisa ser aprimorado para melhorar o perfil de detecção do material genético do vírus em amostras clínicas. Importante salientar que não houve amplificação específica nos controles negativos (julgando apenas pelo T_m) e o controle positivo (pVSV 15.8) funcionou adequadamente.

6.14. Genes de referência

Os genes de referência ou normalizadores são importantes controles usados em qPCR. São muito utilizados em estudos de expressão gênica e podem ser de grande utilidade em testes diagnósticos. No presente trabalho, os genes de referência assumem grande importância no controle da integridade do material genético das amostras, após todo o processamento das mesmas (LISOWSKI, 2008).

6.14.1. β -Actina

A FIGURA 29 a seguir demonstra como foram desenhados os iniciadores para β -actina bovina.

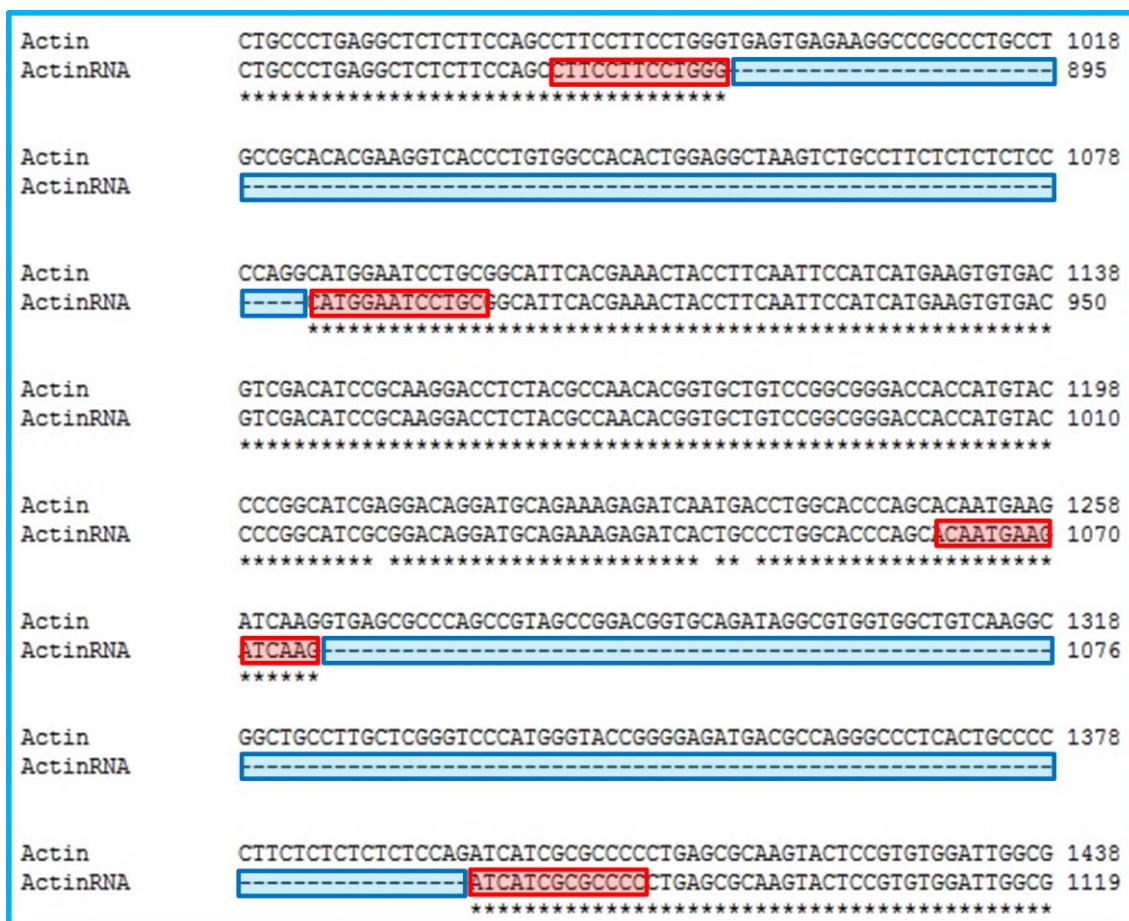


Figura 29. Desenho dos iniciadores de β -actina bovina. Alinhamento do segmento de DNA (Actin) e do segmento de RNA (ActinRNA) de parte da β -actina bovina. Os destaques em vermelho representam as seqüências dos iniciadores. Os destaques em azul representam regiões de não correspondência entre as seqüências de DNA e RNA do gene da β -actina bovina.

Após o desenho dos iniciadores, foi feito um estudo das características gerais dos mesmos através do programa Oligo Calc (KIBBE, 2007), para certificar-se do cumprimento de requisitos básicos para os iniciadores utilizados em qPCR (TABELA 5).

Tabela 5: Relação dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para a β -actina bovina.

Iniciador	Seqüência	Tamanho (nt)	Conteúdo GC (%)	Tm (°C)	Fragmento (pb)
ACT BOV F	5'-CATTACAGAACTACCTTCAATTCC-3'	25	40	62,5	172
ACT BOV R	5'-GATGTTCTTGATCTTCATTGTGCTGG-3'	26	42	64,6	

Além dos dados apresentados na TABELA 5, os iniciadores foram verificados quanto à formação de dímeros (pareamento mínimo de cinco bases) e de alças (pareamento

mínimo de quatro bases) através do mesmo programa (Oligo Calc), o que não foi observado para nenhum dos iniciadores.

As sequências dos iniciadores foram comparadas com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Essa análise demonstrou que os iniciadores são capazes de reconhecer de forma eficiente o RNAm da β -actina dos bovinos.

6.14.2. HPRT

Os iniciadores para HPRT bovina estão relacionados na TABELA 6 a seguir.

Tabela 6: Relação dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para a HPRT bovina.

Iniciador	Sequência	Tamanho (nt)	Conteúdo GC (%)	Tm (°C)	Fragmento (pb)
HPRT F	5'-TGCTGAGGATTTGGAGAAGG-3'	20	50	58	154
HPRT R	5'-CAACAGGTCGGCAAAGAACT-3'	20	50	58	

Além dos dados apresentados na TABELA 6, os iniciadores foram verificados quanto à formação de dímeros (pareamento mínimo de cinco bases) e de alças (pareamento mínimo de quatro bases) através do mesmo programa (Oligo Calc), o que não foi observado para nenhum dos iniciadores.

As sequências dos iniciadores foram comparadas com as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank, utilizando-se o programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Essa análise demonstrou que os iniciadores são capazes de reconhecer de forma eficiente o RNAm da HPRT dos bovinos.

Apesar dos dados apresentados, os iniciadores desenhados para os genes de referência não foram testados na reação. Não houve tempo hábil para que os mesmos chegassem para serem testados na qPCR.

VII. DISCUSSÃO

As células Vero foram facilmente cultivadas durante os primeiros experimentos, constituindo-se uma boa escolha como sistema celular, tendo em vista que o VSV pode se multiplicar em uma diversidade de tipos celulares diferentes (LETCHWORTH, 1999; OIE, 2008).

Apesar de estar estocado no freezer -70°C durante muitos anos, a amostra viral apresentou efeito citopático pronunciado em um pequeno intervalo de tempo (menos de 24 h). Os primeiros experimentos já serviram para auxiliar a caracterização da amostra viral como sendo de VSV, já que este é conhecido por apresentar um ciclo de multiplicação simples e com grande capacidade de produção de partículas (LETCHWORTH, 1999; OIE, 2008).

Alguns cuidados especiais foram levados em consideração durante os processos de passagem do vírus em monocamada de células. As passagens do vírus foram feitas com uma baixa multiplicidade de infecção, por causa do risco de formação de partículas defectivas (LETCHWORTH, 1999; LYLES & RUPPRECHT, 2007). Em todos os processos, foram utilizadas as células Vero mantidas em meio 199, para evitar a ocorrência de mudanças ambientais, que pudessem levar a mutações no genoma viral. Já foi demonstrada para o VSV-NJ, a importância do ambiente para a evolução do vírus, diferentemente de outros vírus com genoma RNA de polaridade negativa, em que o fator temporal é mais relevante (Ex: *Influenza A virus*) (RODRÍGUEZ, 1996). Essas preocupações tiveram por base a utilização do material genético da amostra viral amplificada para a produção do plasmídeo, controle positivo da qPCR, que não deveria apresentar mutações em sua sequência específica de VSV.

O ensaio de titulação do vírus obtido revelou a eficiência do processo de multiplicação, que gerou um grande volume de sobrenadante com um alto título viral. O estoque viral foi suficiente para as etapas subsequentes.

O ensaio de formação de cometas foi útil na caracterização da amostra viral, já que possui resultados conhecidos para o VSV (ZHU & YIN, 2006). Apesar da dificuldade na contagem dos cometas, é interessante notar que houve relação entre a quantidade de cometas e a quantidade de placas de lise formadas utilizando a mesma diluição do vírus (FIGURA 9).

A extração de RNA utilizando o kit QIAmp® Viral RNA (QIAGEN®, U.S.A.) foi eficiente e forneceu quantidade adequada de RNA para a etapa de produção de cDNA. A produção do cDNA não foi avaliada diretamente, pois não foi feita uma dosagem, mas o processo foi testado de forma indireta através de uma PCR convencional, com os iniciadores VSV F/R. Como se pode ver pela FIGURA 10, o resultado foi satisfatório tanto para a produção de cDNA quanto para a PCR convencional, tendo em vista a amplificação eficiente do fragmento de 227 pb do gene *L* do VSV. Ainda com relação à FIGURA 10, é importante ressaltar que a banda inespecífica que aparece um pouco acima da banda relativa a 500 pb do *Ladder*, não apareceu no gel de agarose corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, CA) (dados não mostrados) e, portanto, não foi possível definir a sua origem exata. A coloração com GelRed™ é mais específica para ácidos nucleicos em relação à coloração por prata, que pode corar outros compostos orgânicos. Apesar disso, a banda parece ser de material genético e em alguns casos, como diluição do cDNA antes da PCR, a banda diminuía de intensidade consideravelmente (dados não mostrados). A banda inespecífica supracitada não ocasionou problemas maiores, já que o material utilizado na clonagem foi extraído da banda específica do gel de agarose.

A extração de DNA do gel foi feita de forma eficiente, fornecendo uma quantidade adequada de material genético para o processo de ligação em plasmídeo. Pelos cálculos, na proporção de 3:1 (inserto:plasmídeo), era necessária uma quantia aproximada de 11,0 ng de DNA. Nesse caso, foi utilizado 1,0 µL do extrato (~17 ng) no processo de ligação ao plasmídeo pGEM-T. Todo o volume da ligação foi utilizado na etapa de transformação bacteriana, que por sua vez obteve um ótimo rendimento, com mais de 100 colônias transformadas. O controle negativo em LB-ágar com ampicilina não apresentou crescimento bacteriano.

A triagem das colônias por PCR, com iniciadores específicos para o inserto de VSV, foi capaz de demonstrar a eficiência dos processos de ligação e transformação bacteriana, já que todas as colônias testadas foram positivas para o inserto de 227 pb do gene *L* do VSV (FIGURA 11).

A obtenção do DNA plasmidial em pequena escala foi importante para dois processos posteriores principais: provimento de material genético para o sequenciamento e utilização do plasmídeo como controle positivo da qPCR do VSV. No experimento feito

com o Kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega Corporation – EUA), foi obtido um bom rendimento, fornecendo uma quantidade total aproximada de 20,4 µg de DNA.

Todo o processo feito até então foi corroborado pelo resultado do sequenciamento. As reações feitas com os iniciadores universais do tipo M13 foram eficientes e resultaram em uma sequência consenso com 100% de similaridade com a sequência do VSV (J02428) presente no GenBank. Dessa maneira, a amostra viral estava adequadamente caracterizada e o plasmídeo estava pronto para ser utilizado como controle positivo do qPCR.

Houve uma grande dificuldade no desenho dos iniciadores a serem utilizados na qPCR para o VSV. Primeiramente, existem poucas sequências de genomas completos e de isolados naturais presentes no banco de dados do GenBank, o que dificulta a análise e o desenho de iniciadores capazes de reconhecer o genoma das amostras presentes nos espécimes clínicos. Outro problema é que o VSV apresenta muitas diferenças nas sequências mesmo entre os vírus do mesmo sorotipo. O VSV é um vírus com genoma de RNA e apresenta uma alta taxa de mutação durante o seu ciclo de multiplicação, uma característica que surge a partir do mecanismo de ação da RNA polimerase viral, que não apresenta uma atividade revisora e comete erros durante o processo de transcrição do genoma (LETCHEWORTH, 1999; LYLES & RUPPRECHT, 2007). Regiões totalmente conservadas praticamente não existem e, portanto, são escolhidas aquelas em que as diferenças entre as sequências são menores (RASMUSSEN, 2005). A região do gene *L* (RNA polimerase) apresenta certo grau de conservação e também foi escolhida como alvo em outros trabalhos envolvendo diagnóstico de VSV (RASMUSSEN, 2005; HOLE, 2006; FERNÁNDEZ, 2007). Outros iniciadores, envolvendo outras regiões do genoma do vírus, também poderiam ser testados.

O processo de transcrição sequencial do VSV resulta em uma maior produção de RNAm dos genes mais próximos da região 3' do genoma, em relação aos genes mais distantes da mesma (IVERSON, 1982). O gene *L* está situado na porção 5' do genoma e apresenta uma taxa menor de transcrição em relação aos outros. Entretanto, como o teste diagnóstico do presente trabalho foi desenhado para detectar o genoma do vírus, a taxa de transcrição menor do gene *L* em relação aos outros não seria uma limitação para o ensaio.

Ainda em relação às diferenças nas sequências das amostras de VSV, há uma grande dificuldade em desenhar iniciadores capazes de detectar os dois sorogrupos de VSV (VSV-I e VSV-NJ). Dessa maneira, foi analisada a importância de cada sorogrupo em relação à região de interesse. O VSV-NJ apresenta maior importância na América do Norte, enquanto que o VSV-I representa o sorogrupo de maior importância epidemiológica na América do Sul (LÓPEZ *et al.*, 1996-1997). Portanto, os iniciadores foram desenhados a partir de análises de sequências relacionadas ao sorogrupo do VSV-I (VSIV, VSAV e COCV), já que apresenta uma maior importância para o Brasil e países vizinhos. A limitação em apenas um sorogrupo possibilitaria o desenvolvimento de um teste mais específico, apesar das diferenças nas sequências entre as amostras de VSV-I (FIGURA 13). Como esperado, a análise dos iniciadores com as sequências disponíveis no GenBank mostrou grande especificidade com relação ao sorogrupo VSV-I, incluindo as amostras estudadas (VSIV, VSAV e COCV).

Outra prova de especificidade adequada foi o teste com as sequências disponíveis no GenBank para os vírus relacionados (*Vaccinia virus*, *Orf virus*, *Bovine viral diarrhea virus 1*, *Bovine herpesvirus 1*, *Bovine herpesvirus 2*, *Bovine herpesvirus 5* e *Bluetongue virus*). Os iniciadores não apresentaram pareamento relevante com as sequências desses vírus.

O primeiro teste prático realizado com os iniciadores demonstrou a eficiência dos mesmos. O referido teste, de gradiente de temperatura, mostrou a eficácia de amplificação em várias temperaturas e, principalmente, no perfil recomendado para a qPCR (59,1 e 60,4°C). Dessa forma, os iniciadores estavam de acordo com os requisitos necessários para a qPCR.

A metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real permite o monitoramento do progresso da reação. Dessa forma, os dados são coletados ao longo da PCR, em vez de serem apenas no final, como ocorre na PCR convencional. A qPCR utiliza o momento do ciclo da reação no qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez, em vez da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. O tempo no qual o aumento significativo do sinal é observado depende da quantidade inicial do ácido nucléico alvo, ou seja, quanto mais alto o número de cópias iniciais do ácido nucléico, mais rápido o sinal será observado (INVITROGEN, 2008).

A metodologia teve como sistema de detecção o corante Eva Green™ (Biotium, Hayward, CA), que representa uma nova geração de ligantes de DNA. Esse tipo de corante apresenta uma maior afinidade e uniformidade de ligação com o DNA dupla fita em relação aos anteriores (Ex: Sybr Green I®), o que acarreta em um sinal de fluorescência mais potente e curvas de dissociação mais precisas. Além disso, possui um nível de inibição da PCR menor em relação aos corantes mais antigos (INVITROGEN, 2008).

De maneira geral, um corante de DNA para qPCR apresenta duas características importantes: aumento da fluorescência quando ligado ao DNA dupla fita e não provoca inibição considerável da PCR. As vantagens do corante incluem a possibilidade de ser utilizado para monitorar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla fita e sem a necessidade de sonda, o que reduz a configuração do ensaio e os custos de execução. A principal desvantagem do sistema de corante é a possibilidade de gerar sinais falso-positivos, já que pode haver a ligação do corante em sequências não específicas de DNA dupla fita, uma vez que a molécula de Eva Green™ se liga a qualquer DNA dupla fita (INVITROGEN, 2008).

A qPCR (item 5.12.3) demonstrou a eficiência dos iniciadores VSV RT F/R utilizando essa metodologia. A reação foi capaz de amplificar de forma específica as amostras de cDNA e plasmídeo de VSV (pVSV 9.28). As diluições de cDNA e plasmídeo foram úteis para avaliar de forma preliminar a sensibilidade da reação. Como pode ser visto na FIGURA 15, as diluições na base dois para o cDNA e na base dez para o plasmídeo, geraram diferenças de Ct de aproximadamente três unidades. Não houve diferença significativa no Tm das amostras positivas, sendo que o valor encontrado foi de 81.685 ± 0.063 °C. Houve amplificação inespecífica no controle negativo, tendo em vista que o Tm resultante foi diferente das amostras positivas.

O mix da qPCR proposto neste trabalho foi produzido em sua totalidade no próprio Laboratório de Vírus do ICB/UFMG. Dessa maneira, foi preciso pensar em uma maneira de se obter uma reação o mais homogênea possível. A técnica de qPCR apresenta uma sensibilidade elevada, sendo que os erros relativos à pipetagem e heterogeneidade de reagentes são proeminentes. A alternativa encontrada para tais problemas foi a preparação de um pré-mix, feito para um número maior de reações, que

minimizaria os erros citados anteriormente e garantiria uma reprodutibilidade do teste (RAYMAEKERS, 2009).

Os resultados obtidos foram satisfatórios, tendo em vista que a reprodutibilidade foi alcançada apenas após a preparação do pré-mix. Os resultados anteriores à utilização de pré-mix não eram satisfatórios, pois a reação apresentava padrões diferentes em cada etapa da padronização. Esses problemas eram causados principalmente por erros de pipetagem, com a utilização de volumes muito pequenos ($<1,0 \mu\text{L}$). A utilização do pré-mix foi uma boa alternativa para diminuir o grande número de pipetagens nas etapas de padronização. O primeiro pré-mix foi feito apenas com o corante Evagreen™, tampão de reação e parte da água, já que os outros reagentes necessitavam de padronização das suas respectivas concentrações.

A apresentação de um pré-mix também é útil para a validação de lotes do teste diagnóstico. A validação de um lote de pré-mix para um grande número de reações, através do uso de controles positivos e negativos, possibilita um total controle dos ensaios realizados posteriormente com aquele estoque da reação (BELÁK, 2006).

Em relação à padronização do teste, os resultados foram diferentes do esperado, principalmente com relação à concentração de iniciadores. Normalmente, a concentração final de cada iniciador fica em torno de 50 a 400 nM (5 e 40 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ respectivamente), sendo que 200 nM é um valor habitual. A padronização do teste resultou em um valor de concentração de iniciador igual a 1,25 $\mu\text{mol}/100 \mu\text{L}$ (12,5 nM), o que representa possivelmente uma característica diferenciada do mix utilizado. Além disso, o mix caseiro em questão apresenta alto grau de variação a partir de pequenas modificações. Isso pode ser observado nas curvas de padronização da concentração de iniciadores (FIGURA 18). Uma possibilidade seria a utilização de outros reagentes com o objetivo de estabilizar o mix da reação em uma proporção aceitável, tendo em vista que o mix comercial não apresenta variações tão elevadas.

A padronização da concentração de MgCl_2 e dNTP apresentou resultados dentro do padrão esperado, apesar de não haver diferenças significativas nas curvas obtidas da padronização do dNTP. Normalmente, a concentração de Mg^{2+} fica em torno de 3 e 6 mM e o dNTP em torno de 30 μM de cada.

Para complementar a padronização do teste, foi obtida uma curva padrão com os reagentes padronizados. A curva apresentou um coeficiente linear adequado (R^2 : 0.999), mas a sensibilidade apresentada não foi ideal (1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (FIGURA 22). O mix comercial apresentou sensibilidade mais alta (10,0 $\text{fg}/\mu\text{L}$) e ainda com uma eficiência abaixo da esperada (FIGURA 16). O objetivo era o de padronizar uma reação que não apresentasse amplificação inespecífica no controle negativo, o que foi alcançado, mas a sensibilidade ficou prejudicada, o que é indesejável para um teste diagnóstico. A concentração de iniciadores deveria ser otimizada posteriormente, mas os resultados sugerem que outros iniciadores deveriam ser testados.

Um componente essencial no mix caseiro foi o ROX[®], utilizado como referência passiva da reação. Ele emite fluorescência em um comprimento de onda diferente do Evagreen[™], sendo que a mesma é captada pelo aparelho durante toda a reação. A fluorescência emitida pelo ROX é constante durante toda a reação, enquanto que a emissão pelo Evagreen[™] depende da amplificação do DNA, o que permite ao aparelho fazer a correção entre a fluorescência de fundo (ruído) e a fluorescência gerada pela amplificação do DNA na reação em cadeia da polimerase (INVITROGEN, 2008).

Os testes de especificidade corroboraram os estudos realizados durante o desenho dos iniciadores. Os iniciadores VSV RT F/R mostraram-se bastante específicos para o VSV, sendo que nenhuma amplificação foi observada nos testes com os vírus relacionados e o *Staphylococcus aureus*.

Os testes da RT foram úteis para avaliar a eficiência da produção de cDNA para a qPCR. De todos os protocolos testados, a melhor reação foi obtida com o uso do iniciador VSV RT F sozinho. É importante salientar que o iniciador VSV F, utilizado no início do trabalho (TABELA 2), foi testado também na RT (dados não mostrados) e os resultados foram parecidos com aqueles obtidos utilizando o VSV RT F. O protocolo ideal seria com a utilização dos iniciadores randômicos, já que a realização de apenas uma RT poderia servir para testar o cDNA em várias reações em busca de material genético de vírus com genoma de RNA. Entretanto, o protocolo com iniciadores randômicos resultou em uma reação pouco sensível na qPCR (FIGURA 25). Os resultados sugerem que os outros protocolos, principalmente com o VSV RT F mais o Oligo dT, poderiam ser melhor explorados, em busca de uma padronização da reação, já que apenas uma concentração de cada iniciador foi testada (FIGURA 25).

A otimização da concentração de iniciadores foi útil para aumentar a sensibilidade da reação, utilizando amostras de origem bovina. A escolha da concentração de 4,0 pmol/100 µL (40 nM) de cada iniciador baseou-se na obtenção de uma sensibilidade adequada e amplificação inespecífica do controle negativo em um nível tolerável. Em concentrações maiores o ganho em sensibilidade não era tão elevado e a amplificação inespecífica do controle negativo se tornava pronunciada (FIGURA 26).

O tratamento do extrato de RNA com DNase I representa uma etapa adicional e poderia ser indicada apenas se apresentasse uma melhora nos resultados. Esse procedimento poderia melhorar a eficiência da RT, por eliminar a interferência de moléculas de DNA contaminantes, e, conseqüentemente, melhorar o resultado da qPCR. O protocolo testado no presente trabalho não se mostrou eficiente e os resultados da qPCR não foram adequados. Além da perda de sensibilidade e repetitividade, os resultados se mostraram menos confiáveis, com o surgimento de ampliações com T_m (°C) diferentes do encontrado para o fragmento de 115 pb delimitado pelos iniciadores VSV RT F/R (FIGURA 27). O tratamento com DNase demanda mais tempo e recurso para o teste diagnóstico e, com os resultados apresentados, não poderia ser indicado para uso neste caso. De alguma maneira o protocolo utilizado, feito em uma temperatura relativamente elevada (75°C), pode danificar as moléculas de RNA. Portanto, outros protocolos poderiam ser testados.

O teste com as amostras clínicas do mix caseiro otimizado demonstrou a necessidade de aprimorar a reação, principalmente no que diz respeito à sensibilidade. A reação foi capaz de detectar o material genético do vírus em várias diluições e alcançou uma sensibilidade de 10^5 PFU no experimento proposto (FIGURA 28). Pode-se inferir que o teste seria capaz de detectar o material genético do VSV em uma amostra contaminada com, no mínimo, 100.000 partículas virais.

Os iniciadores desenhados para os genes de referência, β -actina e HPRT, apesar de não terem sido testados na qPCR parecem promissores. Para a escolha dos dois pares foram observadas as características necessárias para a boa funcionalidade na qPCR e em relação aos genes de escolha como referência para bovinos.

VIII. CONCLUSÕES

As etapas iniciais de multiplicação e caracterização da amostra de VSV se mostraram adequadas e eficientes para a obtenção do plasmídeo controle positivo da qPCR.

Os iniciadores desenhados para a qPCR apresentaram resultados satisfatórios nos testes propostos, sendo capazes de detectar de forma específica o material genético do VSV. Entretanto, outros iniciadores poderiam ser testados, com o objetivo de se alcançar os melhores resultados.

O mix caseiro e sua metodologia de preparação demonstraram grande capacidade de gerar resultados satisfatórios na metodologia da qPCR. Contudo, outros reagentes poderiam ser avaliados para a melhoria da qualidade dos resultados.

O teste foi capaz de detectar o material genético do VSV em amostras clínicas de origem bovina, demonstrando seu potencial como método diagnóstico da estomatite vesicular bovina.

IX. PERSPECTIVAS

- ❖ Testar outros iniciadores para detecção do VSV;
- ❖ Aprimorar o mix caseiro para melhores resultados na qPCR;
- ❖ Testar protocolos adicionais de RT com diferentes iniciadores;
- ❖ Testar outros protocolos de tratamento do extrato de RNA com DNase I;
- ❖ Testar os iniciadores dos genes de referência β -actina e HPRT na qPCR;
- ❖ Validar o teste diagnóstico com amostras clínicas obtidas de surtos de estomatite vesicular.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, A. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing, and subtyping of vesicular stomatitis virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 3, n. 4, p. 287-292, 1991.

ALONSO, A. F.; SÒNDAHL, M. S. Antigenic and immunogenic characterization of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol Centro Panamericano Fiebre Aftosa*, v. 51, p. 27-30, 1985.

ALONSO, F. A. *Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares*. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. 1986.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, C. M. et al. Vesicular stomatitis in Brazil I--Isolation and identification of Alagoas strain. *Anais de microbiologia*, v. 25, p. 81-87, 1979.

ARBOLEDA, J.; TRUJILLO, C. La estomatitis vesicular: algunos aspectos históricos, clínicos, eco-epidemiológicos virológicos, de prevención y control. *Rev. Col. Cienc. Pec*, v. 15, p. 356-357, 2002.

BAREFOOT, B. E.; SAMPLE, C. J.; RAMSBURG, E. A. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing influenza nucleoprotein induces CD8 T-cell responses that enhance antibody-mediated protection after lethal challenge with influenza virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 16, n. 4, p. 488-498, 2009.

BELÁK, S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects: A view from the OIE Collaborating Centre for the Application of Polymerase Chain Reaction Methods for Diagnosis of Viral Diseases in Veterinary Medicine. *Vaccine*, v. 25, n. 30, p. 5444-5452, 2007.

BISHOP, D. H. *Rhabdoviruses*. Boca Ratón, Florida: CRC Press, Inc. v. 1, cap. 1, p. 1-21. 1979.

BRANDLY, C. A. et al. Vesicular stomatitis with particular reference to the 1949 Wisconsin Epizootic. In *American Veterinary Medical Association, Proceedings, 88th Annual Meeting Milwaukee, August 20-23*, p. 61-67, 1951.

BRIDGES, V. E. et al. Review of the 1995 vesicular stomatitis outbreak in the western United

States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 211, n. 5, p. 556-560, 1997.

BURTON, A. C. Stomatitis contagiosa in horses. *Vet. J*, v. 73, p. 234, 1917.

COLONNO, R. J. et al. In vitro synthesis of messenger RNA by a defective interfering particle of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 5, p. 1884-1888, 1977.

COMER, J. A. et al. Titers of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype, in naturally infected male and female *Lutzomyia shannoni* (Diptera: *Psychodidae*) in Georgia. *Journal of medical entomology*, v. 29, n. 2, p. 368-370, 1992.

COTTON, W. E. The causal agent of vesicular stomatitis proved to be a filter-passing virus. *J Am Vet Med Assoc*, v. 23, p. 168-179, 1926.

COTTON, W. E. Vesicular stomatitis. *Vet. Med*, v. 22, p. 169-175, 1927.

CURETON, D. K. et al. The length of vesicular stomatitis virus particles dictates a need for actin assembly during clathrin-dependent endocytosis. *PLoS pathogens*, v. 6, n. 9, p. e1001127, 2010.

DE STEFANO, E. et al. Pesquisa de anticorpos contra o vírus da Estomatite Vesicular em bovinos de corte criados na região de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil em 2000. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 40, n. 1, p. 29-35, 2003.

ESCUTENAIRE, S. et al. SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses. *Archives of virology*, v. 152, n. 1, p. 41-58, 2007.

FEDERER, K. E. et al. Vesicular stomatitis virus-the relationship between some strains of the Indiana sero-type. *Research in veterinary science*, v. 8, p. 103-117, 1967.

FRANCY, D. B. et al. Epizoötic Vesicular Stomatitis in Colorado, 1982: Isolation of Virus from Insects Collected Along the Northern Colorado Rocky Mountain Front Range. *Journal of medical Entomology*, v. 25, n. 5, p. 343-347, 1988.

GAO, Y. et al. Recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu combined with anti-CTLA4 antibody eliminates implanted mammary tumors. *Cancer gene therapy*, v. 16, n. 1, p. 44-52, 2009.

GUNSON, R. N.; COLLINS, T. C.; CARMAN, W. F. Practical experience of high throughput

real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *Journal of Clinical Virology*, v. 35, n. 4, p. 355-367, 2006.

HAKHVERDYAN, M. et al. Development of a real-time PCR assay based on primer-probe energy transfer for the detection of swine vesicular disease virus. *Archives of virology*, v. 151, n. 12, p. 2365-2376, 2006.

HAKHVERDYAN, M. et al. Evaluation of a single-tube fluorogenic RT-PCR assay for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *Journal of virological methods*, v. 123, n. 2, p. 195-202, 2005.

HANAHAH, D.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R. [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in enzymology*, v. 204, p. 63-113, 1991.

HANSON, R. P. The natural history of vesicular stomatitis. *Bacteriological reviews*, v. 16, n. 3, p. 179, 1952.

HANSON, R. P. Vesicular Stomatitis. In: GIBBS, E. P. J. *Virus Diseases of food animals*. London: Academic Press, Inc. v.2, cap.21, p.517-39. 1981.

HAYEK, A. M. et al. Financial impact of the 1995 outbreak of vesicular stomatitis on 16 beef ranches in Colorado. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 212, n. 6, p. 820-823, 1998.

HÖFNER, M. C. et al. A hemi-nested PCR assay for the detection and identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. *Journal of virological methods*, v. 50, n. 1, p. 11-20, 1994.

HOLE, K.; CLAVIJO, A.; PINEDA, L. A. Detection and serotype-specific differentiation of vesicular stomatitis virus using a multiplex, real-time, reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, v. 18, n. 2, p. 139-146, 2006.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

IBGE. Produção Animal no 3º Trimestre de 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couroovos_200803comentarios.pdf> Acesso em: 04 ago. 2009.

ICTV. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 02 jun. 2009.

INVITROGEN. *REAL-TIME PCR: From Theory to Practice*. 2008.

KUMAR, S. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics*, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.

LENTZ, T. L. et al. Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor?. *Science*, v. 215, n. 4529, p. 182-184, 1982.

LETCHEWORTH, G. J.; RODRIGUEZ, L. L.; DEL CARRERA, J. Vesicular stomatitis. *The Veterinary Journal*, v. 157, n. 3, p. 239-260, 1999.

LICHTY, B. D. et al. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends in molecular medicine*, v. 10, n. 5, p. 210-216, 2004.

LLEWELLYN, Z. N. et al. Growth and molecular evolution of vesicular stomatitis serotype New Jersey in cells derived from its natural insect-host: evidence for natural adaptation. *Virus research*, v. 89, n. 1, p. 65-73, 2002.

LÓPEZ INZAURRALDE, A. et al. Distribución histórica de la estomatitis vesicular en Brasil. *Bol. Cent. Panamerican. Fiebre Aftosa*, n. 62/63, p. 10-20, 1997.

LUTFALLA, G.; UZE, G. [19] Performing Quantitative Reverse-Transcribed Polymerase Chain Reaction Experiments. *Methods in enzymology*, v. 410, p. 386-400, 2006.

LYLES, D. S.; RUPPRECHT, C. E. *Rhabdoviridae*. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*, Philadelphia-USA, 5th Ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1364-1408, 2007.

MASON, J. The epidemiology of vesicular stomatitis. *Bol. Cent. Panamer. Fiebre Aftosa*, n. 29-30, 1978.

MASON, J.; HERRERA, S. A.; TURNER, W. J. Vesicular stomatitis in Mexico. In: *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*. 1976. p. 234.

MASS, J. *Vesicular stomatitis*. Disponível em <<http://www.vetmed.ucdavis.edu>>. Acesso em: 18 jun. 2009.

McCLELLAN, G. B. Report on the Organization and Campaigns of the Army of the Potomac: To which is Added an Account of the Campaign in Western Virginia, with Plans of Battle-fields. *Sheldon & Company*, 1864.

MEAD, D. G.; RAMBERG, F. B.; MARÉ, C. Laboratory vector competence of black flies (Diptera: *Simuliidae*) for the Indiana serotype of vesicular stomatitis virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, n. 1, p. 437-443, 2000.

MILLER, J. et al. Cytokine-modified VSV is attenuated for neural pathology, but is both highly immunogenic and oncolytic. *International journal of interferon, cytokine and mediator research: Int J Interferon Cytokine Mediator Res*, v. 1, p. 15, 2009.

MUELLER, S. et al. RNAi-mediated immunity provides strong protection against the negative-strand RNA vesicular stomatitis virus in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 45, p. 19390-19395, 2010.

NÚÑEZ, J. I. et al. A RT-PCR assay for the differential diagnosis of vesicular viral diseases of swine. *Journal of virological methods*, v. 72, n. 2, p. 227-235, 1998.

OIE Terrestrial Manual. *Vesicular Stomatitis*. Chapter 2.1.19, p. 367-376, 2008.

OIE. Reports on the animal health status and disease control methods and list A disease outbreaks-statistics. *World Animal Health in 1996*. Part 1, 11-345. 1996.

ORREGO URIBE, A. Avances en las investigaciones sobre la estomatitis vesicular en Colombia. *Bogota: Instituto Colombiano Agropecuario*. 1987.

PUSTIGLIONE NETTO, L. et al. Ocorrência da febre Aftosa e estomatite Vesicular no Estado de São Paulo, no Biênio 1967-1968. *Arquivos do Instituto biológico*, v.36, n.3. 1969.

RAHMEH, A. A. et al. Molecular architecture of the vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 46, p. 20075-20080, 2010.

RASMUSSEN, T. B. et al. Quantitative multiplex assay for simultaneous detection and identification of Indiana and New Jersey serotypes of vesicular stomatitis virus. *Journal of clinical microbiology*, v. 43, n. 1, p. 356-362, 2005.

RAYMAEKERS, M. et al. Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays. *Journal of clinical laboratory analysis*, v. 23, n. 3, p. 145-151, 2009.

READING, C. L.; PENHOET, E. E.; BALLOU, C. E. Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 253, n. 16, p. 5600-5612, 1978.

ROCHE, S. et al. Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cellular and molecular life sciences*, v. 65, n. 11, p. 1716-1728, 2008.

RODRÍGUEZ, L. L. Emergence and re-emergence of vesicular stomatitis in the United States. *Virus research*, v. 85, n. 2, p. 211-219, 2002.

RODRIGUEZ, L. L. et al. Rapid detection of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*, v. 31, n. 8, p. 2016-2020, 1993.

RODRÍGUEZ, L. L.; FITCH, W. M.; NICHOL, S. T. Ecological factors rather than temporal factors dominate the evolution of vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 23, p. 13030-13035, 1996.

RODRIGUEZ-SANCHEZ, B. et al. Improved diagnosis for nine viral diseases considered as notifiable by the world organization for animal health. *Transboundary and emerging diseases*, v. 55, n. 5-6, p. 215-225, 2008.

SAMBROOK, J. et al. *Molecular cloning*. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SAMUEL, S. et al. VSV oncolysis in combination with the BCL-2 inhibitor obatoclax overcomes apoptosis resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Molecular Therapy*, v. 18, n. 12, p. 2094-2103, 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHMIDT, M. F.; SCHLESINGER, M. J. Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein. *Cell*, v. 17, n. 4, p. 813-819, 1979.

SELLERS, R. F.; MAAROUF, A. R. Trajectory analysis of winds and vesicular stomatitis in North America, 1982–5. *Epidemiology and infection*, v. 104, n. 02, p. 313-328, 1990.

TEIDEBOLD, T. C.; MATHER, C. S.; MERRILLAT, L. A. Gangrenous glossitis of horses. Rept. In: *20th Ann. Meeting US Livestock Sanit. Assoc.* 1916. p. 29-42.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

THOMPSON, R. C. A.; CONSTANTINE, C. C.; MORGAN, U. M. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology?. *Parasitology*, v. 117, n. 07, p. 161-175, 1999.

THOULOZE, Maria-Isabel et al. The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *Journal of virology*, v. 72, n. 9, p. 7181-7190, 1998.

TUFFEREAU, C. et al. Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75NTR) can serve as a receptor for rabies virus. *The EMBO journal*, v. 17, n. 24, p. 7250-7259, 1998.

WEAVER, S. C.; TESH, R. B.; GUZMAN, H. Ultrastructural aspects of replication of the New Jersey serotype of vesicular stomatitis virus in a suspected sand fly vector, *Lutzomyia shannoni* (Diptera: *Psychodidae*). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 46, n. 2, p. 201-210, 1992.

WEBB, P. A. HOLBROOK, F. R. Vesicular stomatitis. In: Monath TP, ed. *The Arboviruses*. v.5. Boca Raton, FL: CRC Press; 1-29. 1989.

WHITT, M. A. Generation of VSV pseudotypes using recombinant Δ G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines. *Journal of virological methods*, v. 169, n. 2, p. 365-374, 2010.

WONGTHIDA, P. et al. VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling. *Molecular Therapy*, v. 19, n. 1, p. 150-158, 2011.

WU, Lan et al. rVSV (M Δ 51)-M3 is an effective and safe oncolytic virus for cancer therapy. *Human gene therapy*, v. 19, n. 6, p. 635-647, 2008.