



**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Microbiologia**



Detecção do *Foot-and-mouth disease virus* em líquido esofágico faríngeo (LEF) bovino por RT-qPCR: análise comparativa do desempenho de reagentes de inativação viral

**Luciana Rabello Ferreira**

Belo Horizonte

2020

Luciana Rabello Ferreira

**Detecção do *Foot-and-mouth disease virus* em líquido esofágico faríngeo (LEF) bovino por RT-qPCR: análise comparativa do desempenho de reagentes de inativação viral**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia aplicada.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli.

Coorientador: Dr. Antônio Augusto Fonseca Júnior.

Belo Horizonte

2020





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA

MESTRADO PROFISSIONAL EM MICROBIOLOGIA APLICADA

**ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE LUCIANA RABELLO FERREIRA**

Nº REGISTRO 2018729700

Às 14 horas do dia 19 de outubro de 2020, reuniu-se, de forma virtual, na plataforma TEAMS, a Comissão Examinadora composta pela Betânia Paiva Drumond, Departamento de Microbiologia ICB/UFMG - titular, Dra. Marina Lobato Martins (Fundação Hemominas) - titular e a Orientadora, Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, UFMG, para julgar o trabalho final, "DETECÇÃO DO FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS EM LÍQUIDO ESOFÁGICO FARÍNGEO (LEF) BOVINO POR RT-qPCR: ANÁLISE COMPARATIVA DO DESEMPENHO DE REAGENTES DE INATIVAÇÃO VIRAL", da candidata, LUCIANA RABELLO FERREIRA, requisito final para obtenção do grau de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon – Coordenadora do Curso, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Em seguida, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata, e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de outubro de 2020.

Dra. Marina Lobato Martins

Dra. Betânia Paiva Drumond

Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli. (Orientadora)

Prof. Erna Geessien Kroon

Coordenadora



Documento assinado eletronicamente por **Erna Geessien Kroon, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 20/10/2020, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art.6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de](#)



[2015.](#)

Documento assinado eletronicamente por **Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Cidadã**, em 05/11/2020, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Marina Lobato Martins de Oliveira, Usuário Externo**, em 05/11/2020, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Betania Paiva Drumond, Professora do Magistério Superior**, em 05/11/2020, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.](#)



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0315367** e o código CRC **F2AAAF28**.

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu pai, Leci, primeiro e constante incentivador do gosto pela ciência, a quem  
tanto admiro pela inteligência e jovialidade de alma;

e à Lívia Lima Orzil, uma menina doce, que um dia sonhou, assim como eu, se  
formar Mestre, iniciando este trabalho,  
dedico esta Dissertação.

## **AGRADECIMENTOS**

“O desgaste do percurso da especialização é o esforço de acomodar o seu novo eu. Com o tempo você vai se transformando junto com a pesquisa. É um caminho que não tem volta. Espero que para melhor”. Essas palavras de um amigo expressaram muito bem o que eu estava sentindo à certa altura deste período, mas não conseguia ainda organizar. Tão representativas, faço uso das mesmas para exprimir sobretudo meu crescimento pessoal, ao longo da experiência proporcionada pela pós-graduação. Felizmente, o caminho foi sim, para melhor.

Ao meu querido e grandioso Criador, meu Deus, agradeço o direcionamento, cuidado e oportunidade de desenvolvimento;

Aos meus pais, Mariângela e Leci; irmãos Arthur, Daniela, Aline (em especial pelo auxílio técnico à escrita); e às dindas Rosângela e Solange. Todos eles apoiadores e entusiastas desde sempre;

Ao meu companheiro de vida, Lucas, a disponibilidade, amparo, e esforço para me acompanhar não apenas emocionalmente, mas tecnicamente no discorrer deste projeto;

Aos atenciosos amigos da IASD, todas as orações e torcida. Em especial ao Caio, pelo apoio técnico estatístico. Ao Hugo Monfardini, Josué Cardoso, Queila Garcia, Gisele Luz, Ezequiel Pessoa, Rodrigo Silva, Naor Neves, por serem exemplos de primazia acadêmica em suas respectivas áreas de atuação, demonstrando a coerência entre suas (e também minhas) convicções filosóficas e atitudes, ainda que isso gere preconceito e boicotes em suas vidas profissionais;

Ao Antônio, co-orientador deste trabalho, quem primeiro me proporcionou a oportunidade de iniciação no campo da Biologia Molecular, bem como do Mestrado. Sem ele, eu não teria começado;

À orientadora deste trabalho, Edel, cujo amor e responsabilidade dedicados à pesquisa e à docência chegam a transbordar, e me encantaram desde a única aula

da graduação em que a tive como professora. Apesar de sua excelência profissional, foram sua orientação, apoio e sensibilidade como ser humano que me possibilitaram praticar a resiliência, superar as frustrações e ressignificar tudo. Sem ela, eu não teria finalizado;

À professora Erna Kroon, cuja visão foi além dos muros do Campus, entendendo a importância da integração Universidade/Empresa e lutando diariamente pela valorização do Mestrado Profissional, inclusive e principalmente no próprio meio acadêmico;

Aos integrantes do LVBA/ICB, que, apesar de curto contato, se mostraram muito prestativos todas as vezes em que precisei. Em especial à Silvinha, tão doce, alegre, competente e disposta;

Às amigas que a pós-graduação me deu, Luciana e Bruna, pela amizade, apoio e consultorias;

Aos membros da banca examinadora, Dra. Betânia Paiva Dumond e Dra. Marina Lobato Martins, que doaram seu tempo e análise, acreditando no potencial da pesquisa e do saber;

Finalmente, aos meus colegas e amigos de trabalho, pelo exemplo profissional e pelo grande auxílio, a despeito de uma rotina por vezes desgastante e corrida. Marcelão, Tati, Mari, Aline, Val, Anselmo, Isabelinha, Jacque, Amanda, Dani, Carol, Mikael, Gabriel: este trabalho tem senão um, vários dedos de cada um de vocês. Em especial ao Mateus - quem se mostrou tão solidário em momentos particularmente difíceis - pela inesgotável paciência, constante bom humor, cumplicidade e acessibilidade, cujo exemplo me ensina a ser mais assertiva, eficiente e adaptável. À Marina, Bruno, Dani e Rosi, por fazerem ser mais leve. Ao Paulo e Patrícia, por não apenas compreenderem este momento, mas por se envolverem sinceramente.



## Resumo

A Febre Aftosa (FMD) é uma doença causada pelo *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), um RNA vírus da família *Picornaviridae* e que acomete animais biungulados, ruminantes e suínos domésticos e selvagens, em todo o mundo. Sete sorotipos virais são descritos - A, O, C (já reportados no Brasil), Asia 1, SAT 1, SAT 2 e SAT 3. Os sinais clínicos da infecção incluem a formação de vesículas e erosões epiteliais na língua, palato duro e mole e banda coronária do casco, não sendo os mesmos distinguíveis clinicamente de outras doenças vesiculares. A FMD é uma das principais restrições ao comércio internacional de produtos de origem animal, por ser altamente contagiosa e pelo espectro de hospedeiros. O diagnóstico rápido e preciso e a vigilância epidemiológica são de vital importância para a economia nacional. O Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA) de Minas Gerais, centro de referência nacional para diagnóstico molecular da enfermidade, realiza a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) para detectar regiões conservadas do genoma viral. A garantia da biossegurança é fator imprescindível ao trabalho eficaz na Defesa Agropecuária e toda amostra suspeita de doença vesicular é considerada positiva para a Febre Aftosa desde o momento em que chega do campo até passar pelo processo de inativação viral. O líquido esofágico faríngeo (LEF) é a amostra indicada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico do FMDV em bovinos. O presente trabalho comparou o desempenho da Solução de Lise MagMax™ CORE e do TRIzol® (regularmente utilizado) para a inativação viral utilizando amostras de LEF bovino contaminadas experimentalmente com FMDV sorotipo O [RS BR/80]. A comprovação de desempenho do método de diagnóstico molecular para FMD desde a inativação viral até a RT-qPCR teve por base o Guia de Verificação de Desempenho da Coordenação de Apoio Laboratorial (CGAL) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A eficácia da inativação viral pelo MagMax™ CORE *Lysis Solution* foi comprovada por isolamento viral em células BHK21. Três passagens cegas indicaram a ausência de partículas virais infecciosas nas diluições de  $10^{0,01}$  a  $10^{-1,99}$  TCID<sub>50</sub>/50 µL. O desempenho do método de diagnóstico por RT-qPCR sob as condições de inativação testadas estabeleceu Limite de Detecção de  $10^{1,7}$  TCID<sub>50</sub>/50µL para ambos os inativantes; eficiência de 98,0% e 94,4%, variâncias de repetibilidade de 7,33% e 10,76%, reprodutibilidade intralaboratorial de 9,99% e 16,49%, erro de medida do método de 17,32% e 27,26%, e incerteza expandida de 0,64 e 0,94 Ct, para MagMax™ CORE *Lysis Solution* e TRIzol®, respectivamente. As médias estimadas pelo modelo de regressão múltiplo estabelecido para os métodos de inativação viral testados mostraram superioridade de todos os parâmetros testados para amostras inativadas por MagMax™ CORE *Lysis Solution*, mesmo quando se variou o kit de amplificação, além deste inativante representar uma economia de 35,3% no valor final de cada amostra de LEF testada.

Palavras-chave: Febre Aftosa, FMDV, Inativação viral, RT-qPCR, LEF, TRIzol®, MagMax™ CORE *Lysis Solution*.

## Abstract

FMD is caused by foot-and-mouth disease virus (FMDV), an RNA virus of the family *Picornaviridae*, which infects biungulate animals, ruminants and domestic and wild swine throughout the world. Seven viral serotypes are described - A, O, C (already reported in Brazil), Asia 1, SAT 1, SAT 2 and SAT 3. Clinical signs of infection include vesicle formation and epithelial erosions on tongue, hard and soft palate and the coronary band of the hoof, which are not clinically distinguishable from other vesicular diseases. FMD is one of the main constraints to international trade in animal products, because it is highly contagious and presents a broad host spectrum. Rapid and accurate diagnosis and epidemiological surveillance are of vital importance to the national economy. In the Federal Agricultural Defense Laboratory of Minas Gerais State (LFDA-MG), a national reference center for molecular diagnosis of the FMD, the RT-qPCR is carried out to detect conserved regions from the FMDV genome. The guarantee of biosafety is an essential factor for effective work in Agricultural Defense, therefore every suspected sample of vesicular disease is considered positive for Foot-and-Mouth Disease from the moment it arrives from the field until the viral inactivation process. The oesophageal-pharyngeal sample (OP) is the sample designated by the World Organization for Animal Health (OIE) for the diagnosis of FMDV in cattle. The present work compared the performance of the MagMax™ CORE Lysis Solution and TRIzol® (regularly used) for viral inactivation using bovine OP samples experimentally contaminated with FMDV serotype O [RS BR / 80]. The performance of the molecular diagnostic method for FMD from viral inactivation to RT-qPCR, followed the criteria of the Performance Verification Guide of the Laboratory Support Coordination (CGAL) of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). The effectiveness of viral inactivation by the MagMax™ CORE Lysis Solution was proven by viral isolation tests using BHK21 cells. Three blind passages indicated the absence of infectious viral particles in the dilutions corresponding to  $10^{0.01}$  to  $10^{-1.99}$  TCID<sub>50</sub>/ 50 µL. The performance of the RT-PCR under the tested inactivation conditions established a Detection Limit of  $10^{1.7}$  TCID<sub>50</sub>/50µL for both inactivators used; efficiency of 98.0% and 94.4%, repeatability variances of 7.33% and 10.76%, intra-laboratory reproducibility of 9.99% and 16.49%, method measurement error of 17.32% e 27.26% and expanded uncertainty of 0.64 e 0.94 Ct for MagMax™ CORE Lysis Solution and TRIzol®, respectively. The averages estimated by the multiple regression model established for the tested methods of viral inactivation showed superiority of all tested parameters for samples inactivated by MagMax™ CORE Lysis Solution, even when the amplification kit was varied. In addition, this inactivating solution showed a savings of 35.3% in the final value of each LEF sample tested.

Key words: Foot-and-mouth disease, FMDV, Viral inactivation, RT-qPCR, OP, TRIzol®, MagMax™ CORE Lysis Solution.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1. Produção e exportação mundiais de carne bovina e vitela</b>	<b>24</b>
<b>Figura 2. Representação da partícula do FMDV</b>	<b>28</b>
<b>Figura 3. Mapa esquemático do genoma do FMDV</b>	<b>30</b>
<b>Figura 4. Esquema do ciclo de replicação do Picornavirus</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5. Sinais clínicos da Febre Aftosa</b>	<b>39</b>
<b>Figura 6. Mapa oficial do <i>status</i> da Febre Aftosa no mundo em Janeiro de 2019</b>	<b>64</b>
<b>Figura 7. Mapa oficial do <i>status</i> da Febre Aftosa no mundo: última atualização</b>	<b>65</b>
<b>Figura 8. Mapa oficial do <i>status</i> da Febre Aftosa na América do Sul em 2019</b>	<b>65</b>
<b>Figura 9. Mapa oficial do <i>status</i> da Febre Aftosa na América do Sul: última atualização</b>	<b>66</b>
<b>Figura 10. Fluxo geral de trabalho para teste de inativação viral</b>	<b>85</b>
<b>Figura 11. Preparo das 21 repetições das Soluções de Trabalho D nas diluições cuja inativação viral foi confirmada</b>	<b>86</b>
<b>Figura 12. Preparo das suspensões virais para RT-qPCR não tratadas por processo de inativação viral em teste</b>	<b>88</b>
<b>Figura 13. Fluxo de trabalho para determinação do limite de detecção e eficiência da RT-qPCR, e avaliação do efeito matriz</b>	<b>90</b>
<b>Figura 14. Preparo das suspensões virais sob inativação por TRIzol® para determinação do limite de detecção</b>	<b>92</b>
<b>Figura 15. Preparo das suspensões virais sob inativação por MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i> para determinação do limite de detecção</b>	<b>93</b>
<b>Figura 16. Preparo das suspensões virais a serem inativadas por TRIzol® para os testes de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial</b>	<b>95</b>
<b>Figura 17. Preparo das suspensões virais a serem inativadas por MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i> para os testes de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial</b>	<b>96</b>

<b>Figura 18. Esquema para avaliação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial</b>	<b>99</b>
<b>Figura 19. Plano de amostragem I para determinação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial</b>	<b>100</b>
<b>Figura 20. Plano de amostragem II para determinação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial</b>	<b>101</b>
<b>Figura 21. Plano de amostragem III para determinação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial</b>	<b>103</b>
<b>Figura 22. Cultivo celular. Controle de células BHK21</b>	<b>107</b>
<b>Figura 23. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho A (reagentes inativantes)</b>	<b>107</b>
<b>Figura 24. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho E (matriz biológica LEF)</b>	<b>107</b>
<b>Figura 25. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho B (contaminação experimental de MEM com FMDV, não inativada)</b>	<b>108</b>
<b>Figura 26. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho F (contaminação experimental de matriz biológica com FMDV, não inativada)</b>	<b>108</b>
<b>Figura 27. Pool de líquido esofágico faríngeo bovino coletado com <i>probang</i></b>	<b>109</b>
<b>Figura 28. Confirmação do limite de detecção para matriz biológica LEF contaminada experimentalmente com FMDV e inativada por TRizol®</b>	<b>120</b>
<b>Figura 29. Confirmação do limite de detecção para matriz biológica LEF contaminada experimentalmente com FMDV e inativada por MagMax™ CORE <i>Lysis Solution</i></b>	<b>121</b>
<b>Figura 30. Gráfico de amplificação da RT-qPCR para FMDV de amostras positivas tratadas (A) por TRizol® e (B) por MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i></b>	<b>124</b>
<b>Figura 31. Gráfico de amplificação da RT-qPCR para FMDV de amostras positivas tratadas por (A) TRizol® em MEM e em (B) matriz biológica LEF</b>	<b>125</b>
<b>Figura 32. Gráfico de amplificação da RT-qPCR para FMDV de</b>	

amostras positivas tratadas por <i>MagMax™ CORE Lysis Solution</i> em (A) MEM e em (B) matriz biológica LEF	126
Figura 33. Curva de eficiência da RT-qPCR para FMDV (CALLAHAN et al., 2002) de (A) amostras positivas em MEM e (B) amostras positivas em matriz, tratadas por TRIZOL®	128
Figura 34. Curva de eficiência para FMDV (CALLAHAN et al., 2002) de (A) amostras positivas em MEM e (B) amostras positivas em matriz, tratadas por <i>MagMax™ CORE Lysis Solution</i>	130
Figura 35. <i>Heatmap</i> para valores de <i>Ct</i> empregando-se variação do termociclador em amostras inativadas por <i>MAGMAX CORE™ Lysis Solution</i> versus amostras inativadas por TRIZOL®	138
Figura 36. Gráfico Boxplot para mediana das respostas ( <i>Ct</i> ) de inativação viral por TRIZOL® e por <i>MagMax™ CORE Lysis Solution</i>	141
Figura 37. Médias de <i>Ct</i> dos métodos de inativação avaliados em função dos dias de análise	141
Figura 38. Médias de <i>Ct</i> dos métodos de inativação avaliados em função das parcelas experimentais	142
Figura 39. Médias de <i>Ct</i> dos métodos de inativação avaliados em função dos diferentes kits de RT-qPCR	143
Figura 40. Médias estimadas de <i>Ct</i> para inativação por TRIZOL® e por <i>MagMax™ CORE Lysis Solution</i> em três dias utilizando dois kits de RT-qPCR (A) GoTaq® (Promega, EUA) e (B) QuantiFast (QIAGEN, Alemanha)	147

## Lista de tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos das RT-qPCR para FMDV e gene constitutivo	81
Tabela 2. Insumos da RT-qPCR para FMDV – kit QuantiFast	81
Tabela 3. Insumos da RT-qPCR para gene constitutivo – kit QuantiFast	81
Tabela 4. Ciclagem das RT-qPCR para FMDV e gene constitutivo – kit QuantiFast	81
Tabela 5. Componentes das Soluções de Trabalho para teste de inativação viral por MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i> (µL)	83
Tabela 6. Título viral teórico (TCID <sub>50</sub> /50µL) obtido após a extração de ácidos nucleicos para as etapas de determinação do limite de detecção, eficiência da RT-qPCR e efeito matriz	91
Tabela 7. Insumos da RT-qPCR para FMDV – kit GoTaq®	104
Tabela 8. Ciclagem da RT-qPCR para FMDV – kit GoTaq®	104
Tabela 9. Repetição do teste de isolamento viral em matriz biológica LEF inativada por MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i>	111
Tabela 10. <i>Cycle Threshold</i> (Ct) da RT-qPCR para as suspensões virais tratadas <i>versus</i> não tratadas por MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i> na etapa de verificação da inativação viral	113
Tabela 11. Título viral (log ID <sub>50</sub> /mL) de bovinos infectados por FMDV (GOMES et. al., 1997) comparativamente ao título viral das Soluções	

de Trabalho adotadas na etapa de inativação viral do presente estudo	115
Tabela 12. <i>Cycle Threshold (Ct)</i> dos pontos de concentração para inativação por TRIZOL® versus inativação por MagMAX™ CORE Lysis Solution	118
Tabela 13. <i>Cycle Threshold (Ct)</i> da RT-qPCR para confirmação do limite de detecção de suspensões virais inativadas por TRIZOL® versus suspensões virais inativadas por MagMax™ CORE Lysis Solution	119
Tabela 14. ANOVA para tratamento por TRIZOL® avaliado em 3 dias, por 2 analistas e mesmos equipamento e kit de RT-qPCR	135
Tabela 15. ANOVA para tratamento por MagMax™ CORE Lysis Solution avaliado em 3 dias, por 2 analistas e mesmos equipamento e kit de RT-qPCR	135
Tabela 16. Parâmetros avaliados na verificação de desempenho dos métodos diagnósticos moleculares por RT-qPCR para FMDV, tendo por variável o processo de inativação viral	136
Tabela 17. Estatísticas descritivas das variáveis método, dia, parcela experimental e kit de RT-qPCR	140
Tabela 18. Análise descritiva da variável resposta <i>Ct</i> estratificada por método de inativação utilizado	140
Tabela 19. ANOVA para os dados de <i>Ct</i> obtidos pelo emprego de variáveis nas metodologias diagnósticas em estudo	144
Tabela 20. Modelo de regressão linear múltiplo para os dados de <i>Ct</i>	145

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Arg – Arginina

Asp – Aspartato

BHK – células de rim de hamster neonato (do inglês, *Baby hamster kidney cell*)

CGAL – Coordenação geral de Apoio Laboratorial

Ct- Ciclo limiar (do inglês, *Cycle Threshold*)

ddPCR – Reação em cadeia da polimerase digital em gotas (do inglês, *droplet digital Polymerase Chain Reaction*)

ECP – Efeito Citopático

ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FAM – Amidita de fluoresceína (do inglês, *Fluorescein Phosphoramidite*)

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FMD - Febre Aftosa (do inglês, *Foot-and-Mouth disease*)

FMDV- Virus da Febre Aftosa (do inglês, *Foot-and-Mouth disease virus*)

Gly – Glicina

HS – Heparan – Sulfato

ISH - Hibridação *in situ*

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LEF- Líquido Esofágico Faríngeo (do inglês, *oesophageal-pharyngeal sample [OP]*)

LFDA-MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais



**LBM – Laboratório de Biologia Molecular**

**LDDV – Laboratório de Diagnósticos de Doenças Virais**

**MALT - Tecido linfóide associado a mucosa (do inglês, *mucosa-associated lymphoid tissue*)**

**MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**

**NSP – Proteínas não estruturais (do inglês, *Non Structural Protein*)**

**ORF- Fase aberta de leitura (do inglês, *Open Reading Frame*)**

**OIE- Organização Mundial de Saúde Animal (do inglês, *World Organisation for Animal Health*, anteriormente do francês *Office International des Epizooties*)**

**PANAFTOSA – Centro Panamericano de Febre Aftosa**

**PBS – Tampão Fosfato Salina (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)**

**PCR – Reação em cadeia da Polimerase (do inglês, *Polimerase Chain Reaction*)**

**pH- Potencial Hidrogeniônico**

**PIB- Produto interno bruto**

**PKS- Pseudonó (do inglês, *Pseudoknots*)**

**PNEFA – Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa**

**RNA- Ácido ribonucléico**

**RT-PCR- Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*)**

**RT-qPCR- Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês, *quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*)**

**SAT- Território da África do Sul (do inglês, *South African Territory*)**

**TCID50 – Dose Média Infecciosa em Cultura de Tecido (do inglês, *Tissue Culture Infectious Dose*)**

**USDA- Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês, *United States Department of Agriculture*)**

**UTR- não traduzida (do inglês, *Untranslated*)**

**VPg- Proteína viral ligada ao genoma (do inglês, *Viral Protein Genome-Linked*)**

**VP- Proteína Viral (do inglês, *Viral Protein*)**

**WRLFMD – Laboratório Referência para a Febre Aftosa em Pirbright, Reino Unido (do inglês, *World Reference Laboratory for Foot-and-Mouth Disease*)**

**μmol – Micromol**

**μL – Microlitro**

## Lista de fluxogramas

<b>Fluxograma 1. Etapas de ações da Vigilância Sanitária Animal para suspeita de doença vesicular em biungulados</b>	<b>27</b>
--	-----------

## Lista de quadros

<b>Quadro 1. Dinâmica da infecção pelo vírus da Febre Aftosa</b>	<b>38</b>
<b>Quadro 2. Estimativa do tempo das lesões da Febre Aftosa</b>	<b>38</b>
<b>Quadro 3. Experimentação de inativação viral por protocolos diversos</b>	<b>54</b>
<b>Quadro 4. Testes de inativação viral: preparo das suspensões virais e respectivos títulos virais teóricos (TCID<sub>50</sub>/50µL)</b>	<b>84</b>
<b>Quadro 5. Normalização da carga viral relativa aos distintos processos de inativação viral por TRIzol® e por MagMax™ CORE <i>Lysis Solution</i> e à extração de ácidos nucleicos</b>	<b>94</b>
<b>Quadro 6. Repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial: preparo das suspensões virais e respectivos títulos teóricos (TCID<sub>50</sub>/50µL)</b>	<b>97</b>
<b>Quadro 7. Presença (+) / Ausência (-) de efeito citopático em células BHK21</b>	<b>106</b>

## Sumário

<b>1 Introdução .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1 Partícula viral e estrutura genômica .....</b>	<b>28</b>
<b>1.2 Ciclo de multiplicação viral.....</b>	<b>31</b>
<b>1.3 Portadores.....</b>	<b>34</b>
<b>1.4 Sinais clínicos e Patogenia.....</b>	<b>37</b>
<b>1.5 Transmissão.....</b>	<b>40</b>
<b>1.6 Diagnóstico .....</b>	<b>41</b>
<b>1.6.1 Diagnósticos moleculares .....</b>	<b>42</b>
<b>1.7 Inativação viral.....</b>	<b>47</b>
<b>1.7.1 TRIzol® .....</b>	<b>47</b>
<b>1.7.2 MagMAX™ CORE <i>Lysis Solution</i> .....</b>	<b>55</b>
<b>1.7.3 Labilidade do FMDV.....</b>	<b>57</b>
<b>1.8 Detecção do FMDV em bovinos e em suínos: uso do LEF e do suabe nasal .....</b>	<b>59</b>
<b>1.9 Controle e Prevenção.....</b>	<b>60</b>
<b>1.9.1 Classificação territorial mundial e brasileira para o <i>status</i> da ocorrência da Febre Aftosa .....</b>	<b>63</b>
<b>1.9.2 Programa Nacional de Prevenção e Controle da Febre Aftosa .</b>	<b>67</b>
<b>1.10 Avaliação da técnica diagnóstica molecular por RT-qPCR .....</b>	<b>69</b>
<b>1.10.1 Limite de Detecção .....</b>	<b>70</b>
<b>1.10.2 Eficiência da RT-qPCR .....</b>	<b>71</b>
<b>1.10.3 Repetibilidade e Reprodutibilidade intralaboratorial.....</b>	<b>72</b>
<b>2 Justificativa .....</b>	<b>74</b>
<b>3 Objetivos .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1 Objetivos gerais .....</b>	<b>76</b>
<b>3.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>76</b>
<b>4 Materiais E Métodos .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1 Local de desenvolvimento e amostra viral utilizada.....</b>	<b>76</b>
<b>4.2 Matriz biológica utilizada .....</b>	<b>77</b>

4.3 Inativação viral e Extração de RNA.....	78
4.4 RT-qPCR .....	80
4.5 Teste de inativação viral por protocolo MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit Protocol for Inactivation of Viral Samples (ThermoFisher™) adaptado .....	82
4.5.1 Avaliação de efeito citopático.....	82
4.5.1.1 Supressão do efeito citotóxico dos reagentes à cultura celular .....	82
4.5.1.2 Preparo das Soluções de Trabalho .....	82
4.5.1.3 Cultivo celular .....	84
4.5.2 Repetição do teste de inativação viral .....	85
4.5.3 Confirmação da presença do genoma viral por RT-qPCR .....	86
4.6 Avaliação de desempenho dos métodos variando o tratamento de inativação viral (TRIzol® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution) .....	89
4.6.1 Limite de detecção, eficiência da RT-qPCR e efeito matriz .....	89
4.6.2 Repetibilidade e Reprodutibilidade intralaboratorial.....	95
5 Resultados e Discussão.....	105
5.1 Inativação viral.....	105
5.2 Verificação de desempenho do método diagnóstico molecular do FMD empregando o uso do kit QuantiFast e termociclador CFX96, tendo por variável o processo de inativação viral (TRIzol® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution).....	95
5.2.1 Determinação do limite de detecção.....	117
5.2.2 Verificação do efeito matriz .....	123
5.2.3 Determinação da eficiência da RT-qPCR.....	127
5.2.4 Determinação da repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, incerteza expandida e nível de significância das variâncias do método de diagnóstico molecular de FMD empregando o kit QuantiFast e termociclador CFX96, tendo por variável o processo de inativação viral (TRIzol® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution).....	133

<b>5.3 Avaliação estatística comparativa do desempenho do método diagnóstico molecular de FMDempregando o termociclador CFX96, tendo por variáveis o processo de inativação viral (TRizol® versus <i>MagMAX™ CORE Lysis Solution</i>) e o kit de RT-qPCR (QuantiFast versus GoTaq®) .....</b>	<b>139</b>
<b>6 Conclusões e Considerações Finais.....</b>	<b>148</b>
<b>7 Referências bibliográficas .....</b>	<b>152</b>

## 1 Introdução

A Febre Aftosa (*Foot-and-mouth disease* – FMD) é uma doença causada pelo vírus *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV), um RNA vírus do gênero *Aphthovirus*, família *Picornaviridae*, que acomete animais biungulados (ordem Artiodactyla) como bovinos, suínos, ovinos, caprinos e bubalinos, bem como mais de 70 espécies de animais selvagens ou selvagens em cativeiro (SPICKLER, 2015); (UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE, 1994) como búfalo africano (*Syncerus caffer*), bisão (*Bison* spp.), alce (*Alces alces*), camurça (*Rupicapra rupicapra*), girafa (*Giraffa camelopardalis*), gnu (*Connochaetes gnou*), cervicapra (*Antilope cervicapra*), javali (*Phacochoerus aethiopicus*), impala (*Aepyceros melampus*), diversas espécies de veados, antílopes e gazelas. O FMDV também pode infectar alguns animais que não são membros da ordem Artiodactyla, como ouriços (*Erinaceus europaeus* e *Atelerix prurei*), ursos, tatus, cangurus, ratão do banhado (*Myocastor coypus*) e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (SPICKLER, 2015).

A FMD é atualmente classificada pela Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organisation for Animal Health*) que é também conhecida pela sigla francesa para *Office International des Épizooties* (OIE), como uma das mais contagiosas dentre as doenças infecciosas de animais, sendo de notificação obrigatória. Embora ela não resulte em alta mortalidade em animais adultos (BRITO et al., 2017), sua taxa de morbidade, numa população susceptível, se aproxima de 100% (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013). A taxa de mortalidade da FMD varia entre 1 a 5% em animais adultos, sendo maior (20% ou mais) em bezerros, cordeiros e leitões (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013). Os sintomas da doença compreendem alta temperatura corporal, salivação excessiva, e feridas bolhosas na língua, mucosa labial, boca, tetas, nos espaços interdigitais e bandas coronárias das patas (JAMAL; BELSHAM, 2013).

O FMDV foi o primeiro vírus causador de doença em animais a ser descoberto (LOEFFLER & FROSCH, 1897 apud GRUBMAN; BAXT, 2004). Ele se multiplica rapidamente, sendo transmitido por aerossóis, o que implica numa alta dispersão. Sete diferentes sorotipos já foram descritos, cada qual com uma diversidade de topotipos e de linhagens genéticas (BRITO et al., 2017). São eles: sorotipos A, O, C, *Southern African Territories* (SAT) 1, SAT 2, SAT 3 e Asia 1

(WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2009). O exame de um grande número de amostras provenientes de todo o mundo falhou em revelar a existência de outro sorotipo, embora haja muitos diferentes subtipos, alguns deles bastante distintos de outras amostras do mesmo sorotipo (JAMAL; BELSHAM, 2013).

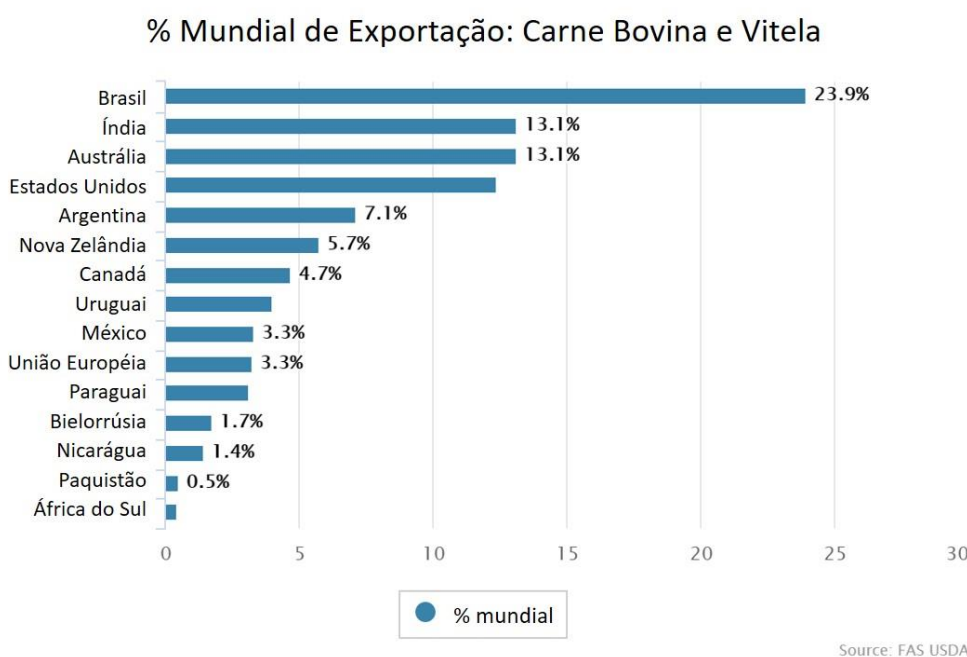
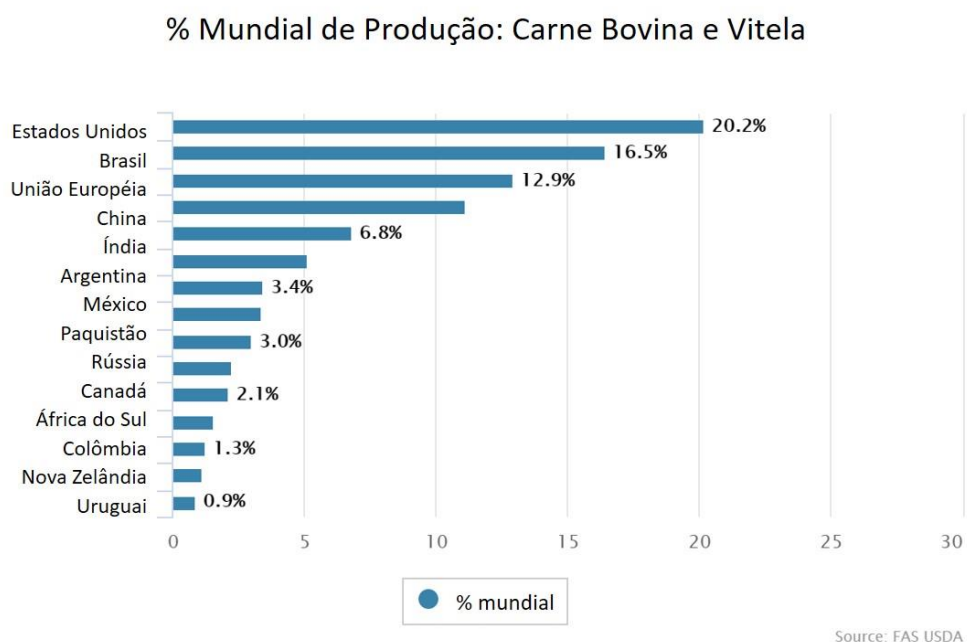
A Febre Aftosa está presente em quase toda a extensão territorial mundial onde há criação de rebanho bovino, tendo sua primeira descrição sido provavelmente realizada em Veneza por volta do ano de 1510 (JAMAL; BELSHAM, 2013). Nas Américas Central e do Sul, já foram registradas ocorrências dos sorotipos A, O e C. Atualmente, o cenário mundial de episódios da Febre Aftosa é monitorado pela OIE, que divulga anualmente o mapa oficial do *status* da FMD de seus países membros.

Relativamente ao Brasil, uma análise ainda que superficial do papel da agropecuária no cenário econômico nacional, é suficiente para que se tenha a dimensão do quão importante é a prevenção da ocorrência da FMD. O PIB do agronegócio compreende, além das atividades primárias realizadas no estabelecimento, as atividades de transformação e de distribuição, o que implica toda uma cadeia do agronegócio afetada, no caso da ocorrência de surtos da Febre Aftosa. Somente no 2º trimestre de 2020, o setor agropecuário contribuiu com R\$125.417 milhões segundo o IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2020).

De acordo com projeções oficiais que compreendem o período de 2016/17 a 2026/27, as taxas de crescimento da produção correspondem a 2,5% ao ano para a carne suína e de 2,1% ao ano para a carne bovina. A produção de leite também deverá crescer, a uma taxa anual entre 2,1 e 3,0%, o que corresponde a passar de uma produção de 34,5 bilhões de litros em 2017 para valores entre 43,0 e 48,0 bilhões de litros no final do período das projeções (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2017a). Dados atuais mostram que a produção brasileira de carne bovina e vitela corresponde a 16,5% da produção mundial total, e a porcentagem de exportação destes mesmos produtos é de 23,9%, o que coloca o país respectivamente em segundo e primeiro lugar do mundo nessas categorias.



**Figura 1: Produção e exportação mundiais de carne bovina e vitela**



Fonte: UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2020a, 2020b. (Informações traduzidas para a língua portuguesa).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Para acessar os gráficos da Figura 1, ao abrir o link disponível em Referências Bibliográficas, é necessário selecionar a opção *Top Countries by Commodity* no Menu *Graphical Query*, selecionar a opção *Meat and Poultry* na coluna à esquerda, e, em seguida, clicar no botão *Visualize*.

A atual pandemia de COVID-19, instaurada a partir do final de 2019, impactou significativamente o crescimento econômico do setor agropecuário mundial, e foram reportadas previsões da diminuição da demanda por proteína animal e da exportação para o comércio de carne bovina, relacionadas ao impacto econômico sobre o consumidor, às interrupções no transporte do comércio global pelo congestionamento de portos e redução da disponibilidade de contêineres, ao fechamento generalizado de restaurantes e estabelecimentos de serviços de alimentação, bem como à redução no turismo e viagens (UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE, 2020c). Ainda assim, a despeito deste cenário, o Brasil mantém posição de destaque tanto na produção de carne bovina, quanto na exportação, compondo inclusive, a posição de liderança do mercado mundial, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA). A produção brasileira de carne bovina, é, inclusive, apontada pelo mesmo órgão como um fator compensatório ao déficit advindo da perda de rebanhos australianos, decorrente de recentes incêndios de grandes proporções. Segundo atualização de dados governamentais brasileiros, o rebanho de bovinos em todo o território nacional no ano de 2019 correspondeu a 216.596.462 cabeças, e o rebanho bubalino foi representado por 1.405.654 animais (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2019a). É, portanto, notável que qualquer enfermidade que acarrete perda significativa na produtividade pecuária, seja de grande relevância para a economia nacional e mundial.

Considerando-se o fato de que a FMD atinge aproximadamente 100% de morbidade e seus efeitos debilitantes, que incluem inapetência e consequente perda de peso, decréscimo na produção de leite e prostração, é possível projetar o impacto negativo que a ocorrência de um surto da doença traria à produtividade pecuária. Destaca-se, pela natureza altamente contagiosa desta doença e pelo fato de ser de notificação compulsória pela OIE, que não por acaso, a FMD tem sido reconhecida como uma das principais restrições ao comércio internacional de animais e de produtos animais (UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; ANIMAL AND PLANT HEALTH

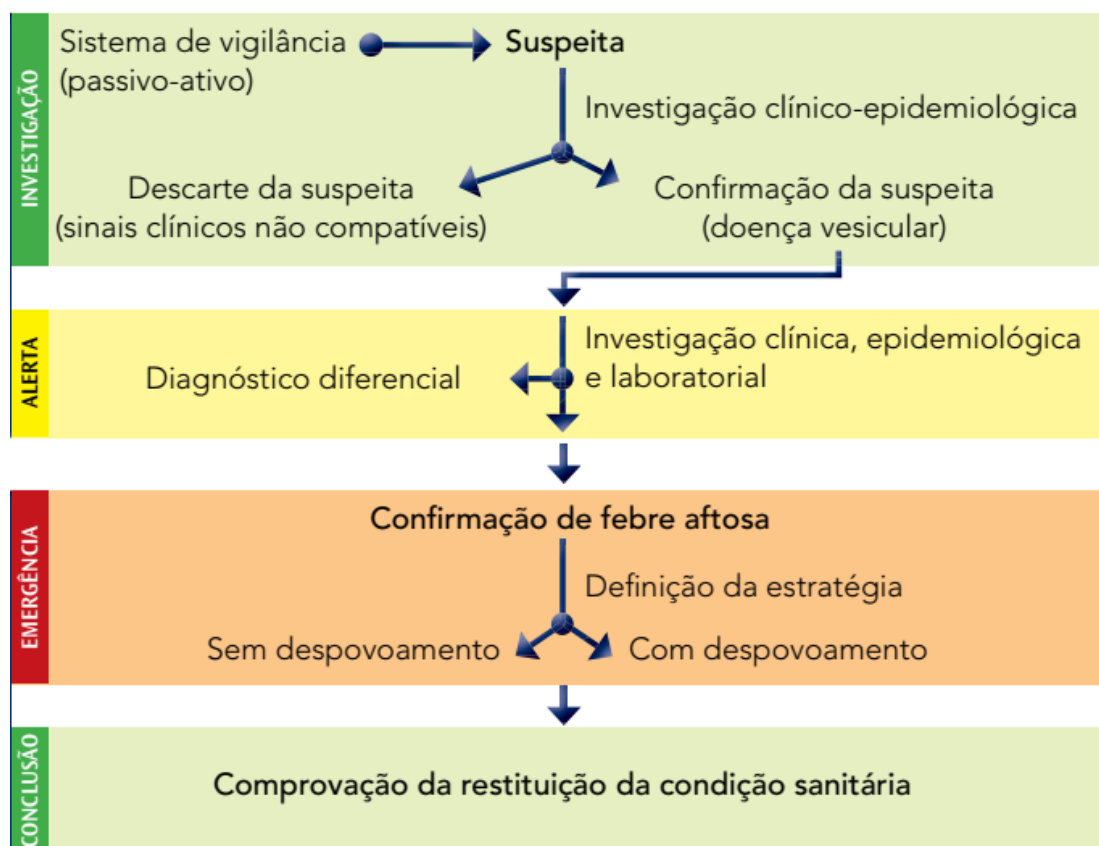
INSPECTION SERVICE, 1994). Há assim, constante preocupação das autoridades sanitárias em torno da ocorrência da Febre Aftosa.

O último episódio de surto de Febre Aftosa registrado no Brasil se deu em outubro de 2005, quando foi notificado nos estados do Mato Grosso do Sul e Paraná, ocasião em que Rússia, Chile e União Europeia fecharam o mercado para a importação de carne dos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, levando a um grande prejuízo de proporções nacionais (SILVA; MIRANDA, 2006). Somente em indenizações pagas aos agricultores, como decorrência deste surto, foram gastos US\$ 8.517.480, e foram eliminados 34.330 animais susceptíveis: 33.064 bovinos, 637 suínos e 629 pequenos ruminantes (BRAZIL. MINISTRY OF AGRICULTURE LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY, 2008).

A fiscalização sanitária animal nacional, tem, portanto, dirigido esforços constantes em relação à prevenção da ocorrência da Febre Aftosa, bem como na elaboração de planos de emergência e contingência em caso de surto. Atualmente procede-se em todo o território nacional, à vacinação compulsória de rebanhos bovinos e bubalinos. Utiliza-se vacina bivalente inativada, formulada com as amostras virais A24 Cruzeiro e O1 Campos, emulsificadas em óleo mineral (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2019a).

Faz-se notar que há uma gama de doenças vesiculares causadas por vírus, que se confundem clinicamente com a Febre Aftosa, e que precisam ser investigadas aos primeiros sintomas comuns a todas elas. Assim, durante casos suspeitos de Febre Aftosa em campo, é realizado o diagnóstico diferencial. O Fluxograma 1 é uma representação esquemática das principais etapas do sistema de vigilância sanitária animal para doenças vesiculares em território nacional, onde destaca-se o diagnóstico na fase “ALERTA”.

### Fluxograma 1: Etapas de ações da Vigilância Sanitária Animal para suspeita de doença vesicular em biungulados

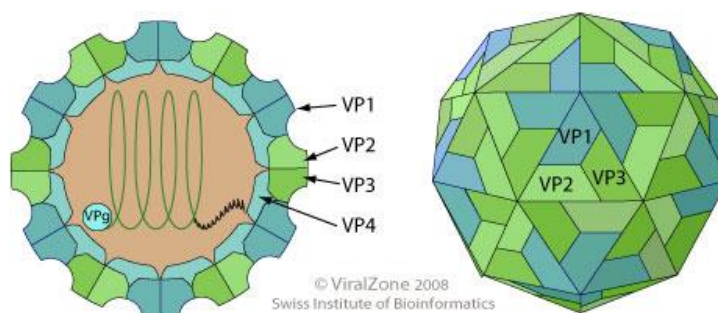


Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2009a, p.9. (Imagem adaptada pela supressão do número do Volume sob o qual o Plano de Ação para Febre Aftosa, Atendimento à Notificação de Suspeita de Doença Vesicular, está organizado).

### 1.1 Partícula viral e estrutura genômica

O *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) pertence ao Reino *Riboviria*, Ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae* e gênero *Aphthovirus* (Goris et al., 2009; ICTV, 2019). É um vírus não envelopado, cujo genoma é RNA fita simples, senso positivo, constituído de aproximadamente 8500 nucleotídeos (nt). Possui capsídeo de simetria icosaédrica, formado de 60 protômeros, cada um consistindo em 4 polipeptídios: VP1, VP2, VP3 e VP4, sendo este último localizado na parte interna do capsídeo. A partícula viral apresenta em torno de 30 nm de diâmetro (CARRILLO, 2012) (Figura 2).

**Figura 2: Representação da partícula do FMDV.**



Fonte: SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (SIB), 2008.

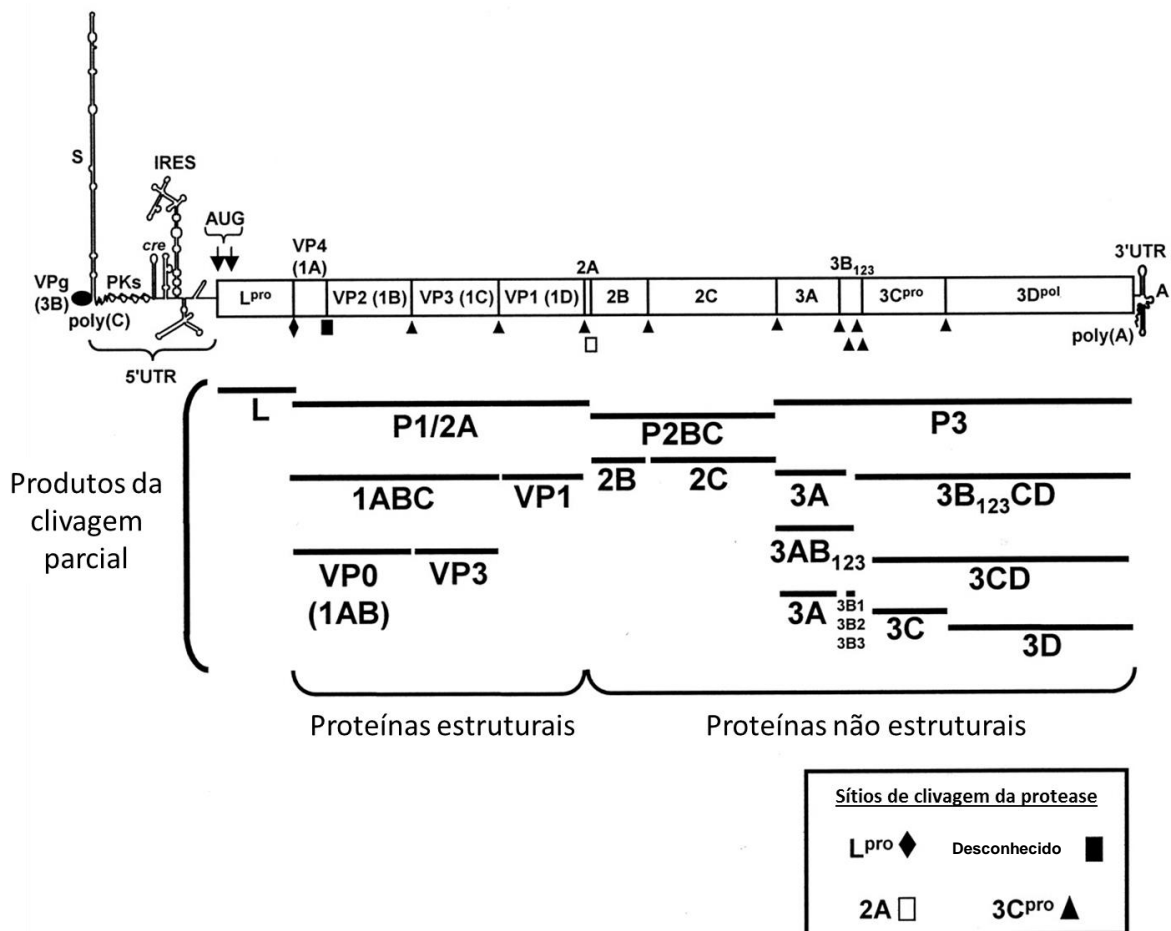
Destaca-se que o RNA viral é infeccioso, funcionando tanto como genoma quanto como RNA mensageiro viral. Uma cauda poli A na porção 3' protege o genoma da digestão por nucleases celulares. A região não traduzida 5'UTR (*5' untranslated*) do FMDV é extremamente complexa, e contém cerca de 1.300 bases, sendo dividida em cinco elementos funcionais que possuem papel importante nos eventos de tradução e replicação do RNA genômico, segundo revisto em Grubman e Baxt (2004) (Figura 3). Uma pequena proteína VPg (proteína viral) está covalentemente ligada à porção 5' e contém cerca de 24 aminoácidos. A região P1 codifica os polipeptídeos estruturais e as regiões P2 e P3 codificam as proteínas não estruturais associadas à replicação (GRUBMAN; BAXT, 2004).

A região genômica que codifica a proteína de capsídeo VP1 (gene 1D) é a mais estudada para o sequenciamento genômico e permite a classificação dos diferentes sorotipos do FMDV. Nos últimos dez anos, o protocolo técnico para

amplificação por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e subsequente sequenciamento da região VP1 (1D) do FMDV usado na FAO/WRLFMD (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/Laboratório Referência para a Febre Aftosa em Pirbright, Reino Unido) gerou dados de sequência para mais de 4.500 isolados de vírus e amostras de campo. Em todos os casos, pelo menos um dos conjuntos de iniciadores de RT-PCR produziu um *amplicon* específico a partir do qual a sequência de VP1 foi determinada (KNOWLES et al., 2016).

Logo após a VPg, está inserida a região "S", de cerca de 360 nucleotídeos que se dobram formando uma haste longa. Esta proteína ainda não possui o seu papel totalmente elucidado, mas, por comparação com outros membros da família *Picornaviridae*, sugere-se que tenha função importante na manutenção da estabilidade genômica durante a penetração celular. Em seguida à proteína S, está inserido o trato poli(C) que compreende 90% dos resíduos de cisteína, com algumas uracilas e adeninas. Estudos com *Enterovirus C* têm mostrado uma associação do fator de ligação do hospedeiro às proteínas poli(rC) (PCBP), com a extremidade 5' do genoma, que pode regular a troca entre as funções de tradução e de replicação genômica (GAMARNIK, 1993). Exatamente após esta estrutura, encontram-se os pseudo-nós (*pseudoknots* - PKS), de função não completamente elucidada. À jusante dos pseudo-nós, foi identificada uma estrutura denominada *cre*, que possui uma pequena alça contendo a sequência conservada - AAACA, essencial para a replicação do genoma. Após esta estrutura, localiza-se a região IRES (sítio de acesso interno para o ribossomo, do inglês *Internal Ribosome Entry Site* - IRES grupo III), que permite a tradução direta da poliproteína (revisto em Grubman e Baxt (2004)). O genoma possui uma única fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* - ORF), codificante de um polipeptídeo precursor, que, uma vez traduzido, será processado por proteases virais, originando várias proteínas funcionais, dentre elas a 3Dpol, a RNA polimerase RNA dependente do vírus. Esta região genômica que a codifica é extremamente conservada, sendo utilizada no diagnóstico molecular (LONGJAM et al., 2011). Além da região codificadora 3Dpol, a região 5'UTR mencionada anteriormente é também muito utilizada no diagnóstico de FMD, já que também contém porções conservadas ao longo de sua sequência (CALLAHAN et al., 2002; REID et al., 2002).

Figura 3: Mapa esquemático do genoma do FMDV.



Fonte: SCHEMATIC MAP OF THE FMDV GENOME., 1969. (Informações traduzidas para a língua portuguesa).

## 1.2 Ciclo de Multiplicação viral

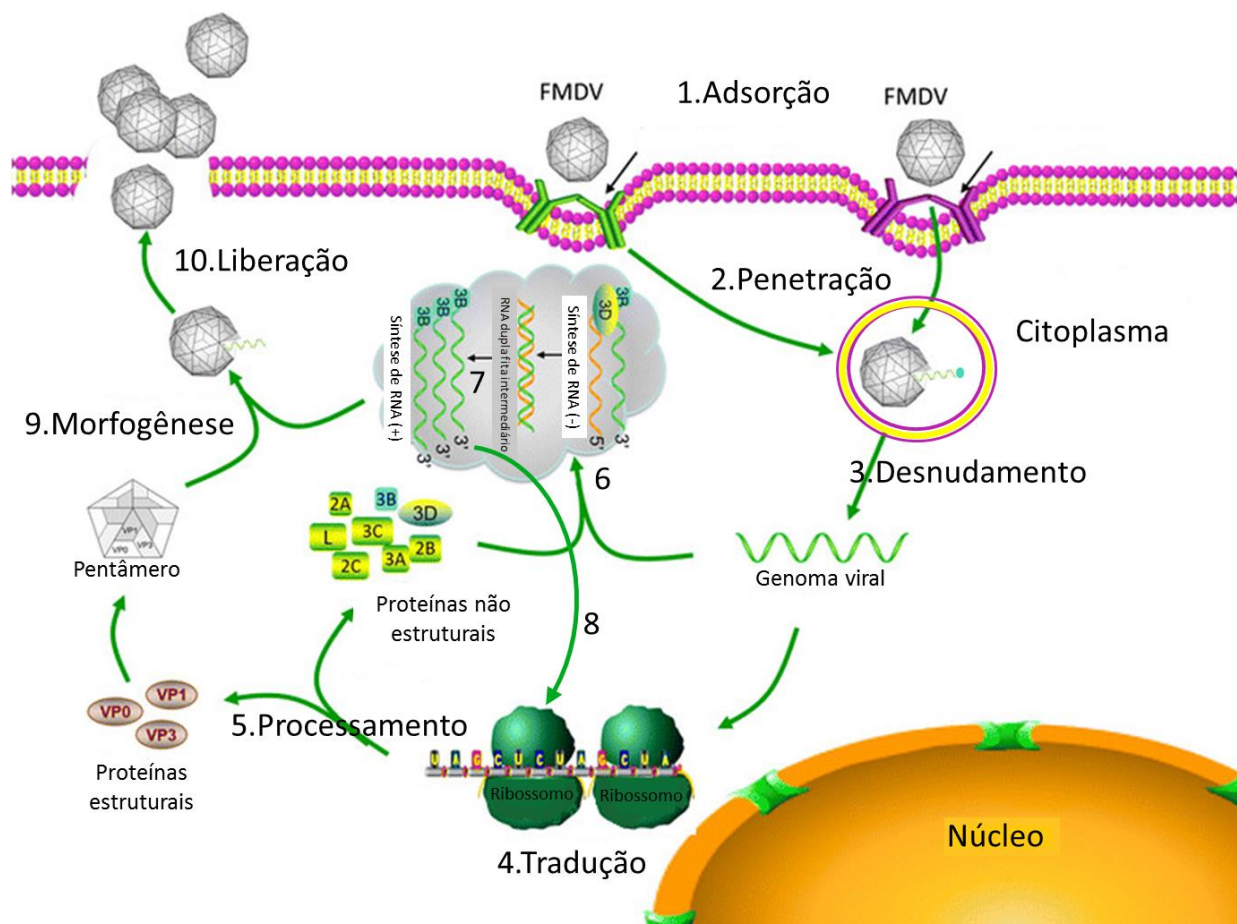
A adsorção do vírus à célula do hospedeiro se dá por meio da sequência de aminoácidos arginina - glicina – aspartato, altamente conservada (Arg - Gly - Asp , RGD), que pode interagir com receptores de integrina sobre a membrana celular para mediar o início da infecção pelo vírus (WANG et al., 2015). Tal sequência de aminoácidos compõe a estrutura de *loop* G-H, formada pelas cadeias  $\beta$ G e  $\beta$ H dos resíduos 140-160 da VP1, protundido na superfície viral. Há indicações de que as proteoglicanas de heparan sulfato (HS) funcionam como um receptor alternativo para o vírus da Febre Aftosa, ou uma via alternativa para a entrada nas células após infecção pelo vírus (BARANOWSKI et al., 1998).

O vírus da Febre Aftosa, assim como outros vírus da família *Picornaviridae*, após a ligação a receptores na membrana celular, induz a formação de um endossomo ácido, onde o material genético viral será desnudado. Uma vez no citoplasma, a indução da tradução do RNA viral e interrupção da tradução do RNA da célula, ocorrem concomitantemente. As proteínas necessárias para replicação são traduzidas a partir do RNA viral senso-positivo. A cópia do genoma produz um RNA senso-negativo complementar e a partir deste, há formação de fitas senso-positivas (CARRILLO, 2012). Segue-se a morfogênese e liberação viral através de lise celular.

O ciclo de multiplicação viral está esquematizado na Figura 4.



**Figura 4: Esquema do ciclo de replicação do Picornavirus**



Fonte: GAO; SUN; GUO, 2016. (Informações traduzidas para a língua portuguesa; inserção da numeração das etapas 1 a 10; inserção da seta número 8; inserção da representação da membrana do endossomo ácido após a penetração viral).

(1) Ligação do vírus a um receptor celular. (2) Penetração do vírus na célula e (3) desnudamento pela acidificação endocítica, com a liberação do RNA viral no citoplasma da célula e remoção da VPg (3B) do RNA do vírus. (4) A tradução é iniciada. (5) A poliproteína nascente é clivada imediatamente produzindo proteínas virais individuais. (6) A síntese de RNA viral ocorre em vesículas membranosas (complexo de replicação), induzida pelas proteínas virais. Fitas RNA senso positivo são copiadas pela RNA polimerase viral, dando origem às fitas senso negativas, que por sua vez darão origem a novas replicatas de fitas senso-positivas (7). (8) A fita de RNA é traduzida para produzir proteínas virais

adicionais. (9) Após a tradução ocorre a morfogênese, onde novas partículas virais são formadas e liberadas por lise da célula (10).

O vírus da Febre Aftosa induz alterações morfológicas nas células infectadas que incluem o arredondamento celular, condensação da cromatina, vacuolização nuclear, proliferação de vesículas membranosas, e mudanças na permeabilidade da membrana com perda de componentes intracelulares (RACANIELLO, 2013).

Segundo Grubman e Baxt (2004), áreas da faringe e pulmões são os locais de início da multiplicação do vírus, com disseminação rápida para as áreas epiteliais orais e podal. Há possibilidade da disseminação ser mediada por células monocíticas-macrofágicas. Em bovinos infectados experimentalmente via aerossol, verificou-se, por hibridização *in situ* (ISH), que durante as primeiras 24 horas, o vírus estava presente no epitélio bronquiolar respiratório; com 72 horas, foi detectado em células epiteliais da língua, palato mole, pata, amígdala e linfonodos traqueobronquiais (BROWN et al., 1996).

### 1.3 Portadores

Após a recuperação da fase aguda da infecção pelo FMDV, o vírus infeccioso desaparece, com exceção dos baixos níveis que podem persistir na orofaringe de alguns ruminantes. Animais em que o vírus persiste nesta região por mais de 28 dias após a infecção, são referidos como portadores (SALT, 1993; WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a). Muitos vírus são conhecidos por causarem infecções persistentes, atuando por diferentes mecanismos. O mecanismo de persistência depende das características do vírus, tais como o tipo de multiplicação, tipo de genoma e da célula alvo, mas também é influenciada pelas características do hospedeiro (MOONEN; SCHRIJVER, 2000). Um estudo feito por Stenfeldt e colaboradores (2016), concluiu que os suínos não são susceptíveis a tornarem-se portadores de longo prazo. No entanto, proteínas e RNA do vírus da Febre Aftosa em tecidos linfóides são comuns após a infecção clínica ou subclínica nesta espécie. Caprinos e ovinos sem vacinação ou que demonstraram baixo nível de anticorpos após a vacinação, apresentaram sinais subclínicos da doença e se tornaram portadores (MADHANMOHAN et al., 2012).

Para investigar o papel de portadores na transmissão do FMDV em regiões de elevada altitude (Planalto Qinghai-Tibet), e as mutações genéticas no vírus causadas pela pressão seletiva deste ambiente, a espécie animal conhecida como iaque foi infectada experimentalmente, com a amostra FMDV O/Akesu/58. Todos os cinco animais infectados mostraram sinais clínicos típicos da doença. Níveis de anticorpos totais contra o vírus, e anticorpos contra a proteína viral não estrutural 3ABC foram medidos em fluidos de orofaringe e sangue e apresentaram alto nível por pelo menos seis meses, sugerindo que os animais poderiam se tornar portadores (CHANG et al., 2013). Os resultados mostraram que os iaques podem carrear o FMDV por pelo menos oito meses, e a sequência de nucleotídeos e aminoácidos de VP1 compartilhou algumas mutações comuns em amostras isoladas, o que levou à suposição de que a variação de VP1 pode ser uma possível razão para o *status* de portador, e que a infecção persistente pode ser responsável pela geração de novas variantes virais no campo, uma vez que pode levar à mutação gênica (MALIRAT et al., 1994). A relação entre o alto nível de anticorpos e a ausência de sinais clínicos foi

observada entre os animais portadores, contudo, esse alto nível de anticorpos não foi o suficiente para eliminar o vírus completamente.

Em espécies de ruminantes, em particular bovinos e búfalos, o FMDV é capaz de causar infecção subclínica persistente durante a qual os animais podem continuar a liberar o vírus infeccioso além de 28 dias pós infecção, e então, por períodos prolongados de tempo: até três anos em bovinos e cinco anos em búfalos (CONDY et al., 1985; MOONEN; SCHRIJVER, 2000). Dentro de um rebanho de búfalos, o vírus pode ter sido mantido por 24 anos ou mais (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a). No gado, o estado de portador geralmente não persiste por mais de seis meses, embora em pequena proporção possa durar até três anos (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2013).

Stenfeldt e colaboradores (2018) avaliaram a patogênese do FMDV em bovinos, comparando desde a infecção primária à sistêmica, até o estabelecimento de infecção persistente. Foi confirmada a localização da infecção primária e persistente de FMDV em regiões especializadas do epitélio da mucosa nasofaríngea, cobrindo o tecido linfóide associado a mucosa (MALT). Contudo, apesar das localizações microanatômicas idênticas do vírus associadas à infecção primária *versus* persistente de FMDV, houve diferenças notáveis nas características histopatológicas. Consistente com investigações anteriores, a infecção primária por FMDV da nasofaringe bovina foi associada a erosões da superfície da mucosa, bem como a infiltração acentuada de células apresentadoras de antígenos, concomitante ao estabelecimento de viremia. Além disso, o estágio mais avançado da infecção precoce foi associado à multiplicação substancial do vírus que ocorre no epitélio da cripta da tonsila palatina, com acentuada degeneração acantolítica do epitélio em focos infectados. Em contraste, não houve evidência de uma resposta do hospedeiro ativada, associada à infecção persistente por FMDV da mucosa nasofaríngea. Durante o estado de portador, células epiteliais infectadas com FMDV ou pequenos aglomerados de células epiteliais foram dispersos em regiões semelhantes do epitélio MALT, mas sem dano estrutural associado ou ativação inflamatória local. Esses achados são consistentes com estudos anteriores que sugeriram a inibição da resposta antiviral do hospedeiro, bem como a indução de

tolerância imunológica em associação com a persistência do vírus da Febre Aftosa.

Tais observações confirmam o líquido esofágico faríngeo (LEF) bovino como material adequado para coleta com a finalidade de vigilância sanitária animal relacionada a presença do vírus da Febre Aftosa em rebanhos. O mesmo estudo constatou que, dentre os seis animais vacinados contra o FMDV expostos ao vírus da Febre Aftosa, todos foram infectados subclínicamente, com base na detecção de FMDV em secreções e/ou tecidos, tendo cinco deles permanecido portadores persistentemente infectados, conforme determinado pela detecção consistente de FMDV no LEF até a amostragem final 35 dias pós-exposição natural ao vírus. Os portadores possuem título elevado de anticorpos anti-FMDV na circulação, portanto não é possível discriminar por método sorológico os animais que são portadores, daqueles nos quais realmente a resposta imune foi eficaz na eliminação viral.

Por fim, Wright e colaboradores (2010) avaliaram a possibilidade de carreamento do vírus por seres humanos expostos a animais infectados. Dentre os 68 suabes nasais provenientes de 51 pessoas expostas por oito horas a animais infectados, 35 suabes (51,5%) foram positivos para o genoma do FMDV em análise pela técnica de RT-PCR. Apenas uma de 23 pessoas que foram PCR-positivas imediatamente após a exposição a animais infectados com o FMDV, permaneceu positiva no dia seguinte (após 16 a 22 horas da exposição), indicando um baixo risco de transporte prolongado de vírus nas cavidades nasais. Dando suporte a esta conclusão, como parte do mesmo estudo, oito esfregaços nasais recolhidos de pessoal dois a três dias após a sua última exposição a animais infectados em diferentes experimentos com FMDV foram negativos por RT-PCR.

#### **1.4 Sinais clínicos e Patogenia**

O período de incubação do vírus da Febre Aftosa pode variar de acordo com a espécie animal afetada, o inóculo viral, a amostra viral e a via de infecção, havendo relatos de 1-12 dias em ovelhas (com a maioria das infecções surgindo em 2-8 dias), 2-14 dias em bovinos e geralmente dois dias ou mais em suínos (com algumas pesquisas mostrando o surgimento da doença clínica em 18 a 24 horas).

Como ocorre variabilidade de sinais clínicos (Figura 5) de acordo com a espécie hospedeira, a Febre Aftosa é tipicamente uma doença febril aguda com surgimento de vesículas localizadas na coroa do casco, em volta da boca e nas glândulas mamárias. Vesículas podem ocorrer, ocasionalmente, em outros locais, incluindo vulva, prepúcio e outras regiões das patas, como o espaço interdigital. Elas se rompem facilmente, formando erosões. Dor e desconforto conduzem a sinais clínicos como depressão, anorexia, salivação intensa, claudicação e relutância para se movimentar. Em casos graves pode haver descamação de cascos ou patas. Perdas reprodutivas são possíveis, especialmente em ovelhas e cabras. A mortalidade é reportada como rara, exceto em animais jovens, que podem desenvolver miocardite. A maioria dos adultos se recupera entre duas e três semanas, embora infecções secundárias possam retardar a recuperação. Possíveis complicações incluem a perda temporária ou permanente na produção de leite, má formação no casco, claudicação crônica ou mastite, perda de peso e debilidade (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2009a). O Quadro 1 representa as principais fases da patogenia da doença. Os sintomas e a gravidade da Febre Aftosa variam de acordo com cada espécie hospedeira, sorotipo e amostra viral circulante.

**Quadro 1: Dinâmica da infecção pelo vírus da Febre Aftosa**

<b>Patogenia da Febre Aftosa</b>	
a. Inalação do vírus	24 - 72 h (1 a 3 dias)
b. Infecção de células na cavidade nasal, faringe e esôfago	
c. Replicação do vírus e disseminação para células adjacentes	
d. Passagem do vírus a vasos sanguíneos e linfáticos	
e. Infecção de nódulos linfáticos e outras glândulas	
f. Infecção de células da cavidade oral, patas, úbere e rúmen	
g. Começo da febre	72 - 96 h (3 a 4 dias)
h. Aparecimento de vesículas na cavidade oral, patas, úbere e rúmen	
i. Salivação, descarga nasal e claudicação	
j. Ruptura de vesículas e intensificação de sintomas	120 h (5 dias)
k. Final da febre	
l. Final da viremia e começo da produção de anticorpos	desde 8° dia
m. Diminuição do título de vírus em vários tecidos e líquidos	
n. Cura de lesões e o animal reinicia a ingestão de alimentos	desde 10° dia
o. Desaparecimento gradual do vírus de tecidos e líquidos	desde 15° dia
p. Aumento da produção de anticorpos	
q. Cura completa (O vírus pode persistir na região nasofaringeana por tempo de 6 a 24 meses em bovinos e de 4 a 6 meses em pequenos ruminantes, segundo fichas técnicas da OIE)	15 dias

Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2009a, p. 17.

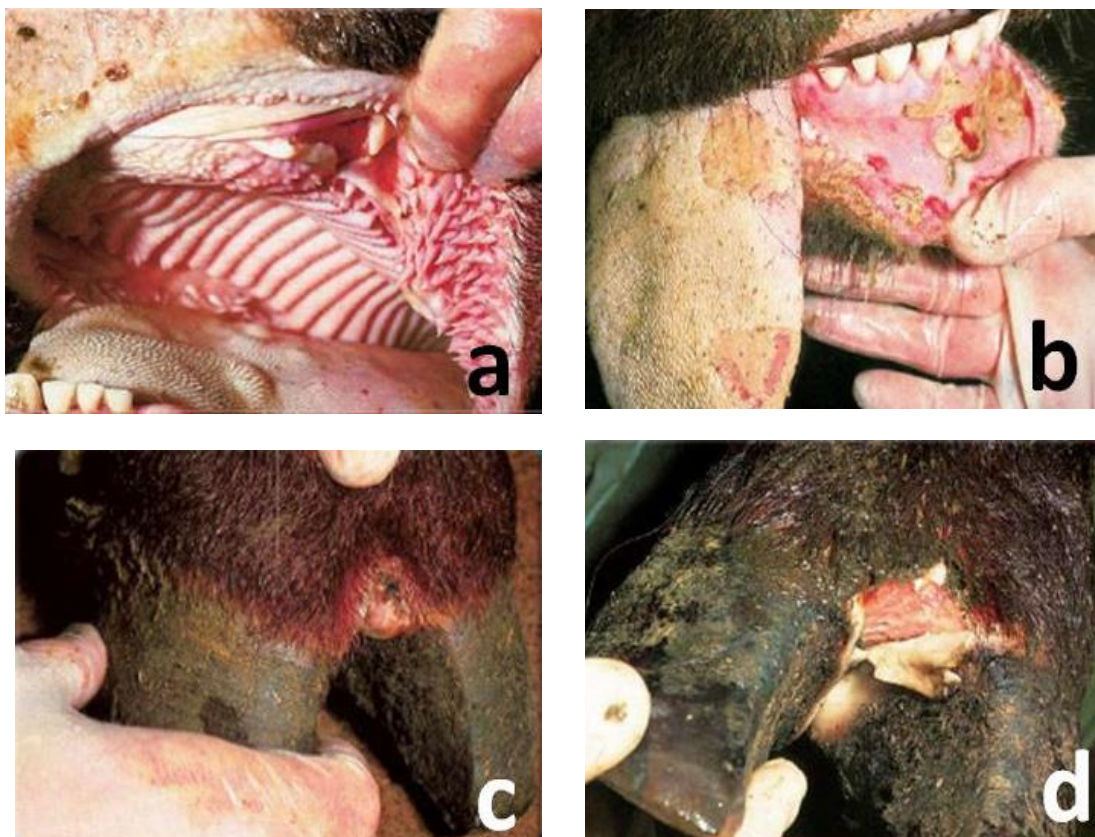
A estimativa do tempo das lesões da Febre Aftosa (Quadro 2) é um pré-requisito para a investigação epidemiológica da origem da infecção. Além disso, é importante estabelecer o tempo das lesões para estimar a duração e a quantidade da excreção de vírus em previsões sobre a propagação da doença.

**Quadro 2: Estimativa do tempo das lesões da Febre Aftosa**

<b>Dia da doença clínica</b>	<b>Aparência da lesão</b>
Dia 1	Descoramento do epitélio seguido de formação de vesícula cheia de fluido
Dia 2	Vesícula rompida com úlcera apresentando assoalho vermelho brilhante de bordas evidentes sem deposição de fibrina
Dia 3	Lesão começa a perder sua demarcação evidente e sua cor brilhante devido à deposição de fibrina
Dia 4	Considerável deposição de fibrina e reparação do epitélio na periferia da lesão
Dia 7	Cicatrização com deposição de fibrina ainda persistente

Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2009b, p.8

**Figura 5: Sinais clínicos da Febre Aftosa**



Fonte: BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2009b, p. 9, 11, 12 e 15.

Bovino com vesícula rompida de dois dias ao longo da gengiva superior, e várias vesículas de um dia ainda não rompidas sobre a língua (a). No quarto dia o animal apresenta uma considerável deposição de exsudato fibrinoso (b). Bovino com uma vesícula de dois dias ainda não rompida no espaço interdigital (c) e bovino apresentando lesão podal de sete dias (d).



## 1.5 Transmissão

O vírus da Febre Aftosa pode ser encontrado em todas as secreções e excreções de animais que apresentam a forma aguda da doença, incluindo aerossóis, saliva, leite, urina, fezes e sêmen, assim como em fluidos associados a vesículas, líquido amniótico e em fetos abortados. A quantidade de vírus eliminado depende da espécie hospedeira e da amostra viral.

O pico de produção de vírus geralmente ocorre temporalmente próximo à ruptura das vesículas, quando a maioria dos sinais clínicos aparecem. No entanto, alguns animais podem eliminar o vírus até quatro dias antes do início dos sinais clínicos. Pode ocorrer também a transmissão por inalação, ingestão ou através de escoriações na pele e membranas mucosas, além da transmissão por fômites, sendo os animais infectados, importantes fontes de disseminação do vírus (ALEXANDERSEN et al., 2003).

As condições ótimas para sobrevivência do FMDV no ambiente foram revisadas e apresentadas por Mielke e Garabed (2020) como sendo temperaturas menores que 20°C, umidade relativa do ar maior que 55% e pH entre 7 e 7,5, mas os autores apontam para uma lacuna existente em relação ao estudo da persistência do vírus em ambientes de clima tropical. Estudos sugerem que o FMDV permaneça viável em média por três meses ou menos, e a presença de material orgânico e proteção da luz solar promovam uma maior sobrevivência.

O vírus da Febre Aftosa é inativado em pH abaixo de 6,0 ou acima de 9,0 e pode persistir na carne bovina ou em outros produtos de origem animal quando o pH permanece acima de 6,0, mas é inativado quando ocorre acidificação dos músculos durante o *rigor mortis* (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2009a). Devido à acidificação não ocorrer em grande intensidade nos ossos e glândulas, o vírus pode persistir nesses tecidos (SPICKLER, 2015).

## 1.6 Diagnóstico

O vírus da Febre Aftosa pode ser detectado em todas as secreções e excreções de animais com infecção aguda, incluindo o ar expirado (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a). Os ensaios utilizados para sua detecção variam não só de acordo com a amostra coletada, como também com o estágio da doença e a finalidade do teste (SPICKLER, 2015). As diretrizes seguidas pela fiscalização nacional encontram-se no Manual de Procedimentos para atenção às ocorrências de Febre Aftosa e outras enfermidades vesiculares da Organização Panamericana de Saúde (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE., 2007) e no Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a).

Para os animais que se encontram na fase aguda da doença, os antígenos e ácidos nucléicos virais podem ser encontrados em uma variedade de amostras, incluindo fluido vesicular, tecido epitelial, secreções nasais e orais, líquido esofágico faríngeo, sangue, leite, e tecidos coletados do miocárdio ou de vesículas encontradas no aparelho digestivo (pilares do rúmen em bovinos) durante a necropsia (SPICKLER, 2015). Nessa fase, é recomendada a coleta de tecidos com vesículas com ou sem rupturas ou fluidos vesiculares (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a) priorizando-se tecido epitelial vesicular bucal, lingual, podal ou de glândula mamária dos animais enfermos (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE., 2007). No caso de a notificação do foco ser tardia (e serem encontrados animais com lesões cicatrizadas), ou em situações onde não há o aparecimento de vesículas, pode-se recorrer à coleta de líquido esofágico faríngeo ou soro, na tentativa de identificar a presença do vírus. Uma vez que o vírus pode causar infecções subclínicas, é possível isolar o mesmo, de animais portadores, coletando-se o LEF, tendo sido este material de grande importância para a realização de inquéritos de FMD, uma das estratégias de controle da doença pela vigilância sanitária animal em casos avançados ou convalescentes, ou em que haja suspeita de infecção na ausência de sinais clínicos, ou mesmo como amostragem nos rebanhos.

Uma amostra de LEF é colhida por inserção de sonda esofágica com um copo coletor na extremidade (*probang*) pela língua até a área orofaríngea seguida de movimentos vigorosos para frente e para trás até cinco vezes, entre a

primeira porção do esôfago e a parede posterior da faringe (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2010). Esta raspagem visa recolher o fluido da orofaringe e especialmente células epiteliais da superfície dessas áreas, incluindo a porção proximal do esôfago, as paredes da faringe, das criptas tonsilares e as superfícies do palato mole, tendo em vista que o vírus pode ficar albergado nas células da mucosa que recobre tais regiões. O LEF deve então, ser adicionado a um volume aproximadamente igual de veículo de transporte; a mistura deve ser agitada suavemente e possuir pH final entre 7,4 e 7,6. As amostras devem ser mantidas sob condições de refrigeração (2 a 8°C) ou congelamento (-20°C) durante o trânsito até sua chegada ao laboratório. Para garantir a refrigeração, é previsto o uso de gelo adicionado com sal comum ou gelo seco, porém neste caso, há o risco de acidificação do material pela penetração de CO<sub>2</sub>, o que poderia prejudicar o isolamento do vírus (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE., 2007).

Os ensaios diretos baseiam-se no uso de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a detecção do antígeno viral ou na transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para a detecção do ácido nucléico viral (SPICKLER, 2015). Testes sorológicos podem ser utilizados na fiscalização para certificar animais para exportação, para confirmar casos suspeitos durante um surto e para monitorar a imunidade dos animais vacinados (SPICKLER, 2015). Eles são capazes de detectar anticorpos contra proteínas virais estruturais, como ELISA ou contra proteínas não estruturais (NSP) do FMDV. Estes últimos são pouco sensíveis, e podem não detectar casos com limitação na replicação do vírus, incluindo o caso de alguns animais vacinados que se tornaram infectados. Devido a tais limitações, testes sorológicos que detectam anticorpos para NSP, são utilizados somente como teste de triagem em rebanhos (SPICKLER, 2015).

### **1.6.1 Diagnósticos moleculares**

Um número crescente de testes de detecção de ácidos nucléicos tem sido usado para o diagnóstico de doenças infecciosas em várias espécies animais, inclusive em seres humanos. Os métodos mais comuns são as tecnologias de plataformas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), que revolucionaram rapidamente o diagnóstico de doenças infecciosas. As

plataformas de amplificação de DNA são sensíveis, específicas, rápidas e robustas. Por serem relativamente rápidas e propensas à automação, constituem-se ideais para situações que requerem respostas urgentes. As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos empregadas nestes ensaios baseiam-se no princípio de uma amplificação exponencial da sequência genômica específica alvo da reação, o que proporciona alta sensibilidade analítica e especificidade. Devido ao alto nível de sensibilidade, medidas especiais de precaução devem ser tomadas para evitar contaminações em laboratório diagnóstico que utiliza a biologia molecular. Para tanto, protocolos laboratoriais rigorosos devem ser empregados envolvendo salas ou gabinetes separados para estágios específicos dos ensaios, mudanças de equipamentos de proteção individual como aventais e luvas de laboratório e programas rigorosos de limpeza (CROWTHER; UNGER; VILJOEN, 2006). O uso de controles apropriados para a garantia de resultados confiáveis, torna-se, portanto, imprescindível. A OIE recomenda para o desenvolvimento e otimização de ensaios para detecção de ácidos nucleicos, que se empreguem (a) um controle da espécie hospedeira alvo, podendo ser ele um gene constitutivo; (b) um controle que revela se ocorreu contaminação da amostra, resultando em produto amplificado quando este não deveria se fazer presente; (c) um controle positivo de análise, para verificação do nível esperado de amplificação no ensaio; (d) um controle de inibição, considerando a existência de possíveis inibidores da reação de PCR numa determinada amostra (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019b).

No contexto de diagnóstico da Febre Aftosa, a reação de PCR será precedida por uma etapa de transcrição reversa já que o genoma do vírus é uma fita de RNA: a chamada RT-PCR. A RT-PCR pode ser usada para amplificar fragmentos do genoma do FMDV em materiais clínicos, incluindo amostras de epitélio, leite, soro e líquido esofágico faríngeo (LEF) (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a). O ensaio de RT-PCR consiste nos três procedimentos sucessivos de (i) extração de RNA da amostra de teste, seguida por (ii) transcrição reversa do RNA extraído, (iii) amplificação por PCR do produto transcrito reversamente e (iv) detecção dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose ou, no caso da RT-qPCR, através de hidrólise de sondas e detecção de fluorescência, em tempo real.

O método oficial preconizado pela OIE para o ensaio de RT-PCR (ou RT-PCR convencional) baseia-se no procedimento descrito por Reid e colaboradores (2000) que tem como alvo a região gênica 5'UTR do FMDV. Já para o ensaio de RT-qPCR (ou RT-PCR em tempo real), são preconizados dois conjuntos de iniciadores e sonda, um que tem por região alvo a 5'UTR do genoma do FMDV, proposto por Reid e colaboradores (2001), e outro que tem como alvo a região 3D, proposto por Callahan (2002). Destaca-se aqui, que a PCR em tempo real possibilita que mais amostras e/ou réplicas sejam testadas em um único ensaio, com conseqüente redução do risco de contaminação, uma vez que os produtos de PCR não precisam ser visualizados por eletroforese, além da evidente redução do tempo de análise, uma vez que o resultado é dado em tempo real.

Jamal e Belsham, (2013) apontam dois testes RT-qPCR *TaqMan* diferentes como de uso comum, um direcionado à sequência de codificação 3D (RNA polimerase) e o segundo visando o sítio de entrada ribossomal interno (IRES) dentro da região 5'UTR. Ambos os testes exploram regiões altamente conservadas em todos os sete sorotipos do FMDV, assim como aqueles testes preconizados pela OIE referidos anteriormente. A região 5' UTR tem cerca de 1300 nucleotídeos de comprimento e contempla o local de entrada do ribossomo interno (IRES) (CARRILLO et al., 2005). A IRES tem cerca de 450 nucleotídeos de comprimento, é responsável pela iniciação de síntese de proteína viral cap-independente e é constituída de *loops (steam loops)* altamente conservados (GRUBMAN; BAXT, 2004). Já a região 3D associa-se às frações da membrana celular em um complexo de proteínas virais que formam o complexo de replicação do RNA no qual a 3Dpol é o principal componente.

Apesar de todas as características mencionadas, nenhum ensaio independente é capaz de detectar o vírus da Febre Aftosa com 100% de sensibilidade (JAMAL; BELSHAM, 2013). Por isso, o usual no LFDA-MG é a realização do ensaio de reação em cadeia da polimerase em tempo real, padrão OIE, que utiliza como iniciador a região 3D (CALLAHAN et al., 2002) e em caso de resultado suspeito, é realizada confirmação com outros iniciadores: 3D, e 5'UTR (*untranslated*).

No experimento descrito por Reid e colaboradores (2001), a RT-PCR em tempo real demonstrou possuir uma sensibilidade comparável à do isolamento

viral, quando oito amostras positivas provenientes de surto de FMDV no Reino Unido em 2001 foram isoladas e detectadas tanto nos ensaios de RT-qPCR quanto pelo isolamento viral. Além da vantagem de menor tempo demandado pela técnica de RT-qPCR comparativamente ao isolamento viral, esta demonstrou a positividade para todos os oito fluidos à partir da análise dos sobrenadantes de cultura de células colhidos após a primeira passagem, ainda que os mesmos não tenham apresentado efeito citopático (ECP) observável até a segunda passagem. Em contraste, o isolamento viral apresentou ECP a partir de 48 horas. Além disso, as duas técnicas foram comparadas através do uso de 108 amostras de sangue/soro provenientes do surto de FMDV no Reino Unido em 2001, e de 55 amostras de sangue/soro de animais experimentalmente infectados com o vírus isolado deste surto. O isolamento viral foi capaz de identificar cinco amostras positivas, e a RT-qPCR, quatro positivas, dentre as 108 amostras provenientes do surto. Relativamente às 55 amostras do experimento de infecção viral, ambos os testes forneceram resultados positivos para todas elas.

Uma nova técnica diagnóstica, a PCR digital em gotas (ddPCR), baseada em amplificação de ácido nucléico foi desenvolvida há aproximadamente 15 anos e vem ganhando espaço recentemente na análise de amostras biológicas diversas. Este método de amplificação altamente sensível visa gerar produtos amplificados derivados de um único alvo, os quais podem ser detectados com diferentes fluoróforos (POHL; SHIH, 2004). Para tanto, a amostra é particionada em gotas que contenham idealmente um ou nenhum DNA molde. Seguindo a estatística de *Poisson*, cada reação é independentemente testada para a presença de uma única molécula de ácido nucléico, o que permite uma quantificação absoluta da amostra, sem a necessidade de uma curva padrão. Essa tecnologia dispensa, portanto, a necessidade de materiais de referência com concentrações conhecidas do alvo e melhora a precisão de quantificação em baixas concentrações, em comparação com a qPCR (GULLETT; NOLTE, 2015).

Recentemente nosso grupo desenvolveu uma RT-ddPCR para o FMDV (PINHEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2018). Utilizou-se na padronização, amostras controle de FMDV (A24 cruzeiro, C3 Indaial e O1 Campos), amostras biológicas (50 LEF de bovinos negativos e 10 amostras positivas de epitélio suíno

provenientes do último surto brasileiro de FMD em 2005), além de ácido nucléico dos 11 vírus que induzem doenças vesiculares e fazem parte do diagnóstico diferencial regulamentar do FMDV (RNA vírus famílias *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae* e *Rhabdoviridae*, e DNA vírus famílias *Parvoviridae*, *Poxviridae* e *Herpesviridae*). Obteve-se sensibilidade analítica igual àquela do método de detecção de FMDV por RT-qPCR (CALLAHAN et al., 2002), com limite de detecção de  $10^{1.4}$  TCID<sub>50</sub>/mL para FMDV e dois fentogramas para plasmídeo circularizado e linearizado carregando o gene FMDV 3D, e alta especificidade, avaliada a partir do teste com as três amostras de FMDV e os 11 vírus (RNA e DNA) distintos que causam doenças vesiculares e tem sinais clínicos similares ao FMDV, das famílias citadas acima. Concluiu-se que ambos os métodos comportam-se de maneira semelhante em sensibilidade e especificidade, entretanto, a RT-ddPCR possui a vantagem de determinar a quantificação absoluta das amostras sem a necessidade de curva padrão, com alta resistência a inibidores de amostras complexas como epitélio e LEF.

## 1.7 Inativação viral

A manipulação de amostras sabidamente ou potencialmente contaminadas com vírus infeccioso requer protocolos de biossegurança específicos, sendo a inativação viral, etapa crucial em qualquer plano de medidas para um trabalho seguro. De maneira destacada esta etapa é de extrema importância para o vírus da Febre Aftosa, dada a sua alta capacidade de infecção pós-contágio (morbidade em torno de 100%) e devido aos programas de controle brasileiros e externos, que seguem rígidas normas de conduta no manuseio do FMVD e até de seu RNA infeccioso.

Inativar um vírus corresponde a tornar uma partícula viral infecciosa, em não infecciosa. Para tanto, existe uma gama de tratamentos químicos e físicos, que preservam ou não partes distintas da partícula viral. Para aplicabilidade em diagnóstico molecular de doença causada por vírus, como é o foco deste trabalho, o material genético do hospedeiro e do vírus em questão na amostra, devem ser preservados. Uma vez que um tratamento de inativação viral promova alterações estruturais de proteínas/lipídeos do envelope ou proteínas do nucleocapsídeo, ele pode ser utilizado eficazmente na inativação do vírus, tornando-o uma partícula inviável (SAKUDO; ONODERA; TANAKA, 2010).

Certas substâncias e reagentes são atualmente consagrados para a inativação viral em amostras biológicas, tanto por atenderem ao requisito da não destruição dos ácidos nucleicos da amostra, como por possuírem um amplo espectro de ação. Destaca-se abaixo as propriedades dos dois reagentes utilizados como inativadores virais no presente trabalho.

### 1.7.1 TRizol®

O TRizol® é uma solução monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina, tiocianato de amônio e outros componentes, capaz de isolar simultaneamente frações separadas de RNA, DNA e proteínas de uma variedade de amostras biológicas. É utilizado no isolamento de diversas espécies de RNA vírus, de grande e pequeno tamanho molecular. Ele mantém a integridade do ácido nucleico devido à inibição da atividade de RNases, enquanto causa ruptura de células e solubiliza componentes celulares durante a homogeneização da amostra (INVITROGEN: TRizol TM Reagent (DNA isolation) User Guide, 2016).



A capacidade do isotiocianato de guanidina - um sal caotrópico - de desnaturar macromoléculas está registrada em vasta literatura (NGO et al., 2017; VON HIPPEL; WONG, 1964).

Contudo, embora seja comum assumir que a metodologia de extração de ácidos nucleicos virais por reagentes de tiocianato de fenol/guanidina inative partículas virais (KOCHEL et al., 2017), essa propriedade inativante não é declarada pelos fabricantes. Isso acontece também para outros métodos usuais de extração de ácidos nucleicos (BOOM et al., 1990; ROSS et al., 2001). Assim, frente à possibilidade de que a inativação de vírus infecciosos possa ser incompleta durante a extração do ácido nucleico, Blow e colaboradores (2004) avaliaram o potencial do reagente TRIzol® LS (Invitrogen Corp.) e do tampão AVL (Qiamp viral RNA mini kit, Qiagen) que também é composto por um sal caotrópico, para tornar suspensões de alfavírus, flavivírus, bunyavírus e filovírus não infecciosas para culturas celulares. Os resultados confirmaram a adequação da aplicação desses reagentes para tornar amostras clínicas ou ambientais não infecciosas.

Além do referido trabalho, outros tantos têm sido realizados no mesmo sentido. O Quadro 3 reúne, além daquele, outros experimentos que visaram testar e estabelecer procedimentos eficazes para inativação de amostras infecciosas, não só relativamente à sanidade animal, mas também à humana, destacando-se a relevância dos testes de inativação viral no contexto do diagnóstico laboratorial de doenças ao redor do mundo.

Quadro 3: Experimentação de inativação viral por protocolos diversos

REFE- RÊNCIA	INATIVADOR TESTADO	VÍRUS			MATRIZ TESTADA	RESULTADO NAS CONDIÇÕES TESTADAS*
		GÊNERO	NOME	ENVELOPE E GENOMA		
BLOW (2004)	TRIzol LS (fenol e isotiocianato de guanidina)	<i>Alphavirus</i>	Western equine encephalomyelitis (WEEV)	Envelopado ssRNA(+)	Células VERO para WEEV, EEEV, VEEV, WNV, RFV  Células MK2 para DENV  Células VERO E6 para EBOV e Marburg	INATIVAÇÃO POSITIVA com TRIzol LS e com tampão AVL separadamente.
			Eastern equine encephalomyelitis (EEEV)			
			Venezuelan equine encephalomyelitis (VEEV)			
	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina)	<i>Flavivirus</i>	West Nile (WNV)	Envelopado ssRNA(+)		
			Dengue (DENV) subtipos 1, 2, 3 e 4			
		<i>Ebolavirus</i>	Ebola (EBOV)	Envelopado ssRNA(-)		
		<i>Marburgvirus</i>	Marburg (MARV)			
	<i>Phlebovirus</i>	Rift Valley fever (RVF)	Envelopado ssRNA (-/+)			
BURTON (2017)	Triton X-100 (Octoxinol)	<i>Ebolavirus</i>	Ebola virus (EBOV)	Envelopado ssRNA(-)	Soro humano contaminado experimentalmente	INATIVAÇÃO NEGATIVA com Triton X-100 e com tampão AVL separadamente;  INATIVAÇÃO POSITIVA com Triton X-100 conjugado ao tampão AVL.
	AVL Buffer (tiocianato de guanidina)					
	Triton X-100 em combinação com AVL Buffer					

COLAVITA (2016)	Triton X-100 (Octoxinol)	<i>Flavivirus</i>	West Nile virus (WNV)	Envelopado ssRNA(+)	Células VERO E6	REDUÇÃO DE INFECTIVIDADE	
		<i>Ebolavirus</i>	Ebola virus (EBOV)	Envelopado ssRNA(-)			
NGO (2017)	TRIZol Reagent (fenol e isotiocianato de guanidina)	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya virus (CHIKV)	Envelopado ssRNA(+)	Células VERO	INATIVAÇÃO POSITIVA para todos os vírus	
	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina)	<i>Flavivirus</i>	West Nile virus (WNV)	Envelopado ssRNA(+)		INATIVAÇÃO NEGATIVA para WNV e CHIKV com AVL Buffer e RLT Buffer	
	RLT Buffer	<i>Ortho- bunyavirus</i>	La Crosse virus (LACV)	ssRNA(-/+)		INATIVAÇÃO POSITIVA para LACV com AVL Buffer e RLT Buffer	
	MagMAX 96 Buffer	<i>Alphavirus</i>	Eastern equine encephalitis virus (EEEV)	Envelopado ssRNA(+)		INATIVAÇÃO POSITIVA	
		<i>Flavivirus</i>	West Nile virus (WNV)	Envelopado ssRNA(+)			
		<i>Ortho- bunyavirus</i>	La Crosse virus (LACV)	ssRNA(-/+)			
	easyMAG Buffer	<i>Mastadenovirus</i>	Adenovirus type 4 (AdV4)	Não envelopado dsDNA		Células epiteliais basais alveolares humanas de adenocarcinoma (A549) para AdV4	INATIVAÇÃO POSITIVA
		<i>Enterovirus</i>	Echovirus type 6 (ECHO)	Não envelopado ssRNA(+)		Células de rabdomyosarcoma humano (RD) para ECHO	
		<i>Betainfluenza- virus</i>	Influenza type B (FLUVB)	Envelopado ssRNA(-)		Células renais caninas de Madin-Darby (MDCK) para FLUVB	

		<i>Simplexvirus</i>	Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)	Envelopado dsDNA	Células pulmonares embrionárias humanas (HEL) para HSV-1	
<b>ROSENSTIERNE (2016)</b>	Magna Pure lysis/binding buffer	<i>Ebolavirus</i>	Ebola virus (EBOV)	Envelopado ssRNA(-)	Meio Eagle Dulbecco modificado (DMEM); Sangue total	INATIVAÇÃO POSITIVA
<b>SMITHER (2015)</b>	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina)	<i>Ebolavirus</i>	Ebola virus (EBOV)	Envelopado ssRNA(-)	Sangue total de camundongos naïve contaminado; Soro de saguis infectados	INATIVAÇÃO NEGATIVA
	Etanol 96% [v/v]					INATIVAÇÃO NEGATIVA
	Aquecimento					INATIVAÇÃO NEGATIVA
	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina) combinado com etanol					INATIVAÇÃO POSITIVA
	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina) combinado com aquecimento					INATIVAÇÃO POSITIVA

VINNER (2007)	Roche MagNA Pure lysis/binding buffer (Octoxinol e isotiocianato de guanidina)	<i>Orthopoxvirus</i>	Vaccinia virus e Cowpox virus	Envelopado dsDNA	Suspensão viral;  Plasma e soro humanos contaminados experimentalmente com sobrenadante de Vaccinia virus;  Sangue colhido em EDTA e contaminado experimentalmente com células VERO infectadas por vaccinia virus;  Meio Mínimo Essencial de Eagle suplementado contaminado experimentalmente com vaccinia virus inoculado em células VERO	INATIVAÇÃO POSITIVA
HORSINGTON (2019)**	DNA/RNA Shield (Conteúdo não declarado pelo fabricante)	<i>Aphthovirus</i>	Vírus da Febre Aftosa (FMDV)	Não envelopado ssRNA(+)	Epitélio lingual de animal infectado experimentalmente em animal vivo  Células LFBK $\alpha$ V $\beta$ 6 infectadas experimentalmente	INATIVAÇÃO POSITIVA
	RNAlater (Sulfato de amônio)					INATIVAÇÃO POSITIVA
	PBS (Tampão de sal de fosfato pH7,4)					INATIVAÇÃO NEGATIVA

<b>HADDOCK (2016)</b>	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina)	<i>Ebolavirus</i>	Ebola (EBOV)	Envelopado ssRNA(-)	Células VERO E6 Camundongos BALB/c Tecido hepático infectado	INATIVAÇÃO NEGATIVA (Inativação positiva foi atingida em períodos prolongados de contato)
	Buffer RLT (tiocianato de guanidine)				Células VERO E6 Camundongos BALB/c	INATIVAÇÃO NEGATIVA
	AVL Buffer (isotiocianato de guanidina) combinado com etanol				Células VERO E6 Camundongos BALB/c	INATIVAÇÃO POSITIVA
	Buffer RLT (tiocianato de guanidine) combinado com etanol				Células VERO E6 Camundongos BALB/c	INATIVAÇÃO POSITIVA
	TRizol Reagent (fenol e isotiocianato de guanidina)				Células VERO E6 infectadas com amostras de fígado e sangue de animais contaminados	INATIVAÇÃO POSITIVA
	Formalina, paraformaldeído e glutaraldeído				Células VERO E6 ou camundongo infectados experimentalmente Células VERO E6 infecatadas com amostra de fígado contaminada experimentalmente	INATIVAÇÃO POSITIVA

	Triton X-100 (Octoxinol) combinado com Tween 20 (Surfactante de polioxietileno não iônico) e aquecimento				Células VERO E6 ou camundongo BALB/c infectados experimentalmente	INATIVAÇÃO POSITIVA
	SDS (sódio dodecil sulfato)				Células VERO E6 infecadas com amostra de fígado contaminada experimentalmente	INATIVAÇÃO POSITIVA

Fonte: Da autora. Cada experimento deve ser observado em relação à carga viral testada e aos diferentes protocolos assumidos, pela consulta do artigo na íntegra. \*INATIVAÇÃO POSITIVA refere-se à inativação em 100% dos testes realizados em cada estudo. INATIVAÇÃO NEGATIVA refere-se à não efetividade de 100% dos testes realizados. \*\*HORSINGTON (2019) trata-se de uma prévia de publicação (*Journal pre-proof*), e por isso a conclusão foi reportada como INATIVAÇÃO POSITIVA, tendo sido os dois testes conduzidos até 48 horas de contato entre amostra contaminada e agente inativante. Para o período de 2 horas, *RNA<sub>later</sub>* não apresentou redução do título viral, em contraste com *DNA/RNA Shield* para todas as amostras testadas.

A OIE estabelece procedimentos para a inativação viral em mercadorias para exportação, com a finalidade de eliminar o risco da disseminação da Febre Aftosa entre países exportadores e importadores de produtos de origem animal (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c). Já em relação à inativação viral para caracterização, manipulação e diagnóstico do FMDV em laboratório, não há procedimentos específicos de inativação viral estabelecidos. Como a diretriz para a purificação do RNA do vírus da Febre Aftosa tanto para aplicação em RT-PCR quanto para RT-qPCR é a metodologia fenol/clorofórmio, conforme descrito no Capítulo 3.1.8 do Manual para Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a), a inativação viral da amostra biológica é consequentemente realizada pelos mesmos reagentes. Isso não significa, contudo, uma restrição à tal metodologia por parte da OIE. O Manual prevê ainda, o uso de métodos alternativos que se baseiam na lise de sal caotrópico e na afinidade do RNA por sílica, ou ainda, extrações automatizadas seguidas por programas de pipetagem automatizados, reconhecendo, inclusive, que procedimentos automatizados melhoram o rendimento da amostra. Desta forma, o enfoque é dado na purificação do RNA, mas está intimamente relacionado à inativação viral da amostra uma vez que um procedimento é subsequente ao outro.

#### **1.7.2 MagMAX™ CORE Lysis Solution**

No LFDA-MG, adota-se como procedimento padrão para a extração de RNA, o método fenol/clorofórmio através do uso do reagente TRIzol®. O protocolo geral para a entrada de uma amostra suspeita de doença vesicular no LFDA-MG, é sua abertura e inativação pelo TRIzol® em nível de biossegurança 4. A amostra segue então, para extração de ácidos nucleicos e aplicação em RT-qPCR em laboratório nível de biossegurança 1. Procede-se também ao isolamento viral, no caso de amostra de tecido animal ou LEF quando a reação de RT-qPCR acusa positivo ou suspeito para FMDV. O isolamento viral é realizado com a amostra de campo em ambiente de biocontenção máxima (nível 4).



Contudo, houve uma demanda induzida do LFDA-MG para a realização de testes de inativação do vírus da Febre Aftosa utilizando-se alternativas ao Trizol®.

O tampão de lise MagMAX™ CORE é um reagente requerido para execução do protocolo de inativação e extração de ácidos nucleicos *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit Protocol for Inactivation of Viral Samples*, desenvolvido pela *ThermoFisher Scientific*. Tal protocolo representa uma possibilidade além da extração automatizada por equipamento da mesma empresa, a fim de fornecer um fluxo de trabalho alternativo manual.

Recentemente, o grupo do Instituto *Pirbright* que constitui o laboratório de referência mundial de Febre Aftosa, com sede no Reino Unido, liderou a avaliação da ação inativante para o vírus da Febre Aftosa, de três reagentes comerciais cujo princípio é a ação da guanidina, com destaque para a solução de Lise MagMax™ CORE, por esta ser nova no mercado. Participou também dos estudos, o Instituto de Referência Nacional Alemã para a Febre Aftosa, *Friedrich-Leoffler*. Além do MagMax™ CORE *Lysis Solution*, foram avaliados o tampão de lise AL (QIAGEN, Alemanha) por ser de uso já implementado no *Friedrich-Leoffler Institute*, e o tampão de lise AVL (QIAGEN, Alemanha) por ser o mais comumente utilizado entre os 27 Laboratórios de Referência Nacional para FMD da União Europeia em suas análises.

Sobrenadante de cultura celular, suspensão de tecido epitelial bovino e leite bovino integral foram contaminados experimentalmente com o vírus FMDV A/IRN/8/2015 ( $10^{6,1}$  TCID<sub>50</sub>/50 µL). A avaliação da infectividade residual do FMDV foi realizada por observação de efeito citopático do vírus em células LFBK- $\alpha\beta_6$ , a partir de diluições nas quais o efeito citotóxico causado pelos reagentes foi suprimido. As amostras foram avaliadas em triplicata, e incubadas a 37°C. O exame de ECP foi realizado diariamente por três dias. A efetividade do tampão de lise para a inativação viral foi considerada quando nenhum ECP foi observado para a triplicata de amostra, nem na primeira e nem na segunda passagem em células adotada para as amostras negativas. A especificidade do ECP naquelas amostras em que ele foi observado, foi confirmada por ensaio de ELISA para antígeno específico de FMDV. Todos os tampões avaliados, incluindo a solução de lise MagMax™ CORE apresentaram-se eficazes para a

inativação viral nas condições testadas, conferindo confiabilidade a este novo reagente no mercado, em sua intenção de uso.

Nosso grupo desenvolveu o trabalho aqui apresentado concomitantemente a tal estudo, diferindo o escopo de aplicação da solução de lise MagMax™ CORE como inativante viral, uma vez que utilizamos a matriz biológica LEF.

### **1.7.3 Labilidade do FMDV**

O FMDV é sensível a substâncias físicas e químicas (ACHARYA et al., 1989). O já estudado processo de desnudamento do RNA viral do FMDV, ainda que permaneça pouco compreendido em relação a outros picornavírus (YUAN et al., 2017), mostra que uma vez dentro do endossomo, a partícula viral sofre desnudamento, o que evidencia a necessidade de condições ácidas para desencadear tal ação.

Num ambiente ácido, o estado de metaestabilidade mantido pela estrutura do capsídeo do FMDV sofre interferência devido à protonação gradual de subunidades das proteínas de superfície, até que as repulsões eletrostáticas geradas acarretem a exposição de proteínas internas do capsídeo, culminando em sua desmontagem e liberação do RNA no citoplasma (FRY; STUART; ROWLANDS, 2005).

Tratamento térmico acima de 60°C para inativar picornavírus termo-resistentes foi reportado por Siegl e colaboradores (1984). O mecanismo térmico de inativação pode ser causado por grandes alterações estruturais irreversíveis, presumivelmente devido ao extenso desdobramento de proteínas (VOLKIN et al., 1997). O Manual de procedimentos para a atenção às ocorrências de Febre Aftosa e outras enfermidades vesiculares (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE., 2007) por sua vez, cita a inativação progressiva do FMDV a temperaturas superiores a 50°C. Na rotina do LFDA-MG, contudo, o procedimento térmico para fins de diagnóstico molecular torna-se inviável em virtude da baixa quantidade de blocos de aquecimento existentes, levando-se em consideração o quantitativo de amostras que podem chegar de uma só vez, e especialmente o tempo dispendido na inativação (pois além do tratamento térmico, as amostras somente saem do nível de biossegurança 4 após descontaminação dos recipientes que as contém, através de aspersão de ácido

cítrico 0,2% por 15 minutos, conforme documento interno do LFDA-MG sob catalogação POP/SB/022- V.6). Atualmente o documento interno do LFDA-MG sob catalogação IS/LDDV/PL/020 preconiza a inativação exclusiva por TRIzol® para amostras suspeitas de conter o FMDV.

Dessa forma, a inativação por reagente químico está em vantagem temporal tendo em vista que após sua adição e homogeneização, os microtubos com amostra já podem seguir para a eclusa de saída, fazendo com que o tempo decorrido no banho ácido cubra o tempo requerido para a inativação viral (que é de 5 minutos em TRIzol® conforme documento interno do LFDA-MG sob catalogação IP/LDDV/PL/039 V.1).

Por fim, a inativação do FMDV tem alcançado sucesso com o tratamento químico através de tampões de lise e outros reagentes comerciais cujo princípio ativo consiste primariamente em agentes caotrópicos, como cloridrato de guanidina, tiocianato de guanidina, conjugado de tiocianato de guanidina e fenol, ou de tiocianato de guanidina, tiocianato de amônio e fenol, conforme reportado por Wood e colaboradores (2020), relativamente aos Laboratórios Referência para a Febre Aftosa dos estados membros da União Européia. Kochel e colaboradores (2017) demonstraram o efeito inativante do reagente TRIzol® LS (cuja concentração dos componentes é um pouco aumentada em relação aos mesmos componentes do TRIzol® – valores não declarados pelo fabricante) para um amplo grupo de famílias virais que inclui *Alphaviridae*, *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Coronaviridae*, *Filoviridae*, *Flaviviridae* e *Paramyxoviridae* em títulos que variavam de  $10^{6,1}$  a  $10^{8,3}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

### **1.8 Detecção do FMDV em bovinos e em suínos: uso do LEF e do suabe nasal**

De acordo com as instruções técnicas da OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019a) o diagnóstico laboratorial do vírus da Febre Aftosa deve ser efetuado utilizando amostras de epitélio apresentando lesões agudas ou amostras do líquido esofágico faríngeo, que são coletadas com a *probang*, uma sonda esofágica, que é introduzida na região faríngea do animal onde o fluido é recolhido no copo acoplado à extremidade da mesma. A coleta de amostras com *probang* requer determinado grau de habilidade técnica, bem como a necessidade de manter os animais imobilizados durante o procedimento.

Stenfeldt e colaboradores (2013) realizaram um estudo com bovinos e suínos infectados experimentalmente com FMDV subtipo O, comparando os métodos de coleta da amostra por suabe oral e a técnica *probang*. Os resultados indicaram que a análise por RT-qPCR com suabe oral é eficiente e confiável para a detecção do RNA do vírus somente durante a fase aguda da infecção em bovinos e suínos. O RNA viral só foi detectado em suabes orais colhidos até dez dias após a infecção, enquanto em amostras colhidas por *probang* a identificação do RNA de FMDV foi possível até 35 dias após a infecção. Isso indicou que a coleta de material por suabe oral para detecção da doença em animais portadores não foi satisfatória, requerendo, portanto, o uso da *probang*. Além disso, como relatado nesta citação, a localização do FMDV, tanto na infecção primária quanto persistente, inclui as regiões especializadas do MALT, comprovando a sua detecção quando do uso desta sonda até em tempos prolongados.

### 1.9 Controle e Prevenção

Como parte do esforço das autoridades sanitárias para controlar a ocorrência da Febre Aftosa, foram criados diversos órgãos e programas a níveis nacional e internacional, como o Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFOTSA) vinculado à Organização Panamericana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPS/OMS), Programa de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa (PNEFA), Programa Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa (PHEFA), dentre outros.

Embora o cenário atual no Brasil seja favorável, o histórico das últimas duas décadas mostra que a perspectiva do risco de reintrodução da doença no país não deve ser ignorada. No final dos anos 90 e início dos anos 2000, foi realizado processo de suspensão da vacinação particularmente na sub-região do Cone Sul, que então evidenciou padrões de transmissão transfronteiriça do FMDV, chegando a avançar para uma epidemia de grandes proporções. Surtos de Febre Aftosa causados pelos vírus dos subtipos O e A, em 2000 e 2001 respectivamente, afetaram Argentina, Uruguai e, em menor medida, o Brasil. Estes surtos foram associados à interrupção prematura da vacinação para alcançar o *status* de “livre de Febre Aftosa sem vacinação”, sem considerar adequadamente os riscos de transmissão sub-regional. Outra situação epidemiológica a ser considerada foi a ocorrência de surtos esporádicos em áreas com *status* de “livre de Febre Aftosa com vacinação”, todos causados por genótipos do vírus do subtipo O, historicamente endêmico na sub-região. Esses genótipos, que circularam entre 1998 e 2011, afetaram áreas de fronteira da Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Os focos evidenciaram a capacidade desses genótipos serem transmitidos em populações submetidas à vacinação periódica e num espaço geográfico transfronteiriço. Além disso, os tais surtos ressaltaram as dificuldades dos sistemas de vigilância para detectá-los e contê-los rapidamente. O último registro de foco da doença em território nacional ocorreu entre 2005 e 2006, no Mato Grosso do Sul e Paraná, e afetou quase toda zona “livre de Febre Aftosa com vacinação” do país. E finalmente, a última ocorrência da doença na América do Sul se deu em 2017/2018, na Colômbia, conforme informe anual de 2018 do laboratório de referência PANAFOTSA-OPS/OMS (OIE/FAO). Os vírus isolados neste surto têm uma relação próxima

com os vírus que foram isolados na Venezuela (que registrou surto de FMDV em 2013), de acordo com a sequência disponível no banco de dados do PANAFTOSA, que apontou então, a possibilidade da disseminação da doença aos movimentos irregulares e ilegais de animais que ocorrem na fronteira Colombo-Venezuelana, como variável de risco mais significativo. O fato de que animais parcialmente imunizados (principalmente de um a dois anos) e infectados podem disseminar a infecção através do comércio ilegal, corrobora a necessidade de um reforço dos controles oficiais, bem como o estabelecimento de medidas de cooperação multinacionais nas áreas fronteiriças.

Muito recentemente, Estados do Paraná, Acre, Rio Grande do Sul e Rondônia, e parte dos Estados do Amazonas e Mato Grosso foram estabelecidos nacionalmente como livres de Febre Aftosa sem vacinação, e aguarda-se o reconhecimento pela OIE. Tal mudança de *status* faz parte de programa em curso para o alcance de todo o território nacional como livre de Febre Aftosa sem vacinação.

Frente a isso, faz-se primordial gerir os riscos da reintrodução da doença, melhorar as condições para detectar precocemente os casos suspeitos, e sanear as eventuais ocorrências de forma rápida e eficiente, de modo a garantir a condição sanitária ideal com o mínimo de impacto econômico e social. Este cenário poderá contribuir para o país galgar novos mercados, que remunerem melhor os produtos pecuários nacionais, frente à elevada competitividade do mercado internacional, preservando o crescimento e lucratividade das cadeias produtivas envolvidas, com geração de emprego e renda.

É essencial que os proprietários e produtores de rebanhos bovinos, suínos, caprinos e outros pequenos ruminantes, mantenham práticas de biossegurança adequadas para prevenir a introdução ou disseminação do FMDV (SPICKLER, 2015). Regulamentos de importação ajudam a prevenir que o vírus da Febre Aftosa seja introduzido a partir de regiões endêmicas, através de animais infectados ou alimentos contaminados. Protocolos de inativação do vírus para vários produtos alimentícios como derivados do leite, carnes, couros e lã foram publicados pela OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019c). Além disso, um programa de controle global tem sido recentemente (relativamente ao histórico da doença no mundo) estabelecido para reduzir a circulação do vírus e a incidência da doença.

Medidas têm sido tomadas para controlar o surto da doença, quarentena, restrições de deslocamento, eutanásia de animais expostos, limpeza, desinfecção de instalações afetadas, equipamentos e veículos (SPICKLER, 2015). Em locais de surto, carcaças dos animais infectados devem ser eliminadas por segurança, utilizando o mecanismo de incineração, enterro em vala sanitária ou qualquer outro processo que garanta a eliminação do agente infeccioso e impeça a propagação da infecção, acompanhada de limpeza e desinfecção (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE., 2007).

A vacinação deve ser feita para reduzir a propagação da doença ou proteger animais específicos (como animais silvestres mantidos em zoológico) durante surtos da doença. A vacina contra a Febre Aftosa somente protege os animais de infecções do sorotipo contido na mesma, e para uma proteção adequada, as amostras vacinais devem ser compatíveis com a amostra de campo circulante (SPICKLER, 2015). É sabido que a infecção por um sorotipo não confere imunidade a outros sorotipos.

No ano 2001, o VII Seminário Internacional de Controle de Vacina Antiaftosa, realizado no Rio de Janeiro, Brasil, apresentou como um dos objetivos, a realização de análises da presença do vírus C3 no continente Sul Americano e avaliação da conveniência em mantê-lo na vacina. Neste período, a vacina continha os 3 subtipos A, O e C, e saponina como adjuvante. Porém, os estudos epidemiológicos apontam que o subtipo C não está mais circulando no Brasil. De acordo com relatórios reportados a WRLFMD, a última ocorrência deste subtipo se deu em 2004 em território nacional; em 1994 na Argentina; no Paraguai em 1974; na Colômbia em 1970; no Peru em 1949; no Uruguai em 1944; e não há dados da ocorrência na Venezuela, Bolívia, Chile, Equador, Guiana e Guiana Francesa.

Assim, na 44ª Reunião Ordinária da Comissão Sul americana para a luta contra a Febre Aftosa (COSALFA 44), foi discutido o risco atual do FMDV subtipo C na região Sul americana, e aprovado que para o ano de 2019 as vacinas em uso no Brasil não manteriam este sorotipo viral, passando a ser bivalentes, mantendo os sorotipos A e O. Ficou estabelecida também, a redução da dose de cinco para dois mililitros (COMISIÓN SUDAMERICANA PARA LA LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA, 2017). Juntamente aos benefícios econômicos gerados pela redução de um antígeno, foram considerados os elementos

tradicionalmente apontados em uma análise de risco, como (a) relacionamentos culturais, comerciais ou outros, com zonas/países que ainda possuem o vírus ativo; (b) estrutura de cuidados veterinários da área/país de origem, (c) capacidade diagnóstica da estrutura de cuidados veterinários do país de destino e (d) vulnerabilidade e receptividade da região de destino. Neste encontro, o plenário apresentou alguns problemas como a persistência do vírus em hospedeiros silvestres, a possibilidade de persistência da infecção em áreas sob baixo uso de vacinação sistemática, e destacou especialmente a importância da estrutura de atenção veterinária do país que se propõe a eliminar um dos antígenos correntes em uso na produção da vacina. Certamente que a vigilância epidemiológica deverá ser reforçada, especialmente em áreas de fronteiras, no período que se segue à retirada de um dos antígenos vacinais.

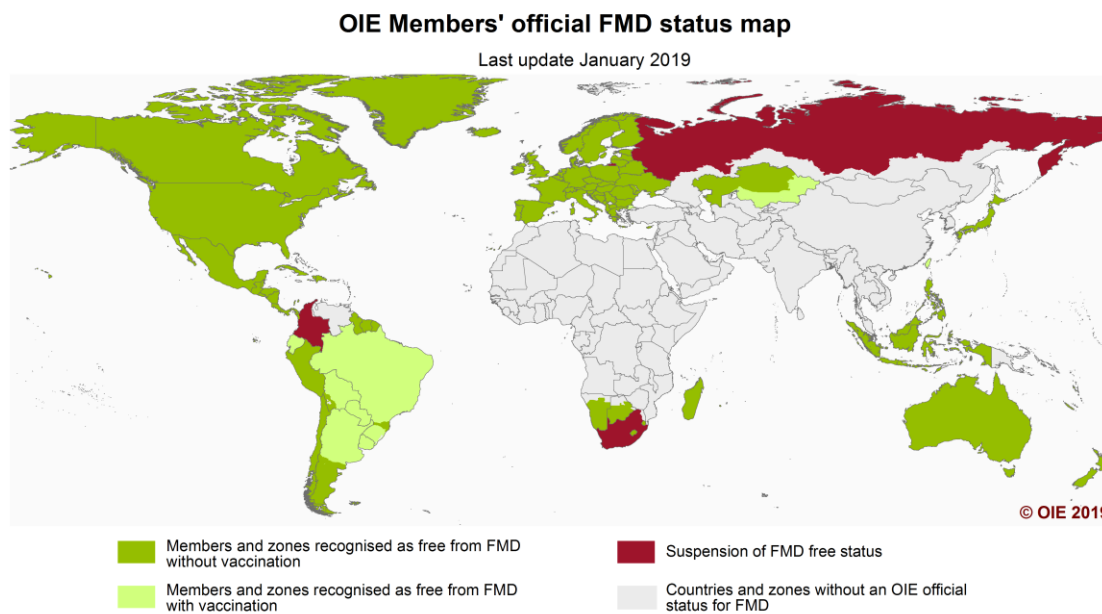
#### **1.9.1 Classificação territorial mundial e brasileira para o *status* da ocorrência da Febre Aftosa**

Em maio de 1994, a OIE desenvolveu um procedimento para o reconhecimento oficial de *status* dos países livres de Febre Aftosa, bem como a aprovação de programas de controle oficiais. Esse reconhecimento foi de grande importância para o comércio internacional, visto que a aquisição e manutenção do estado oficial da doença auxilia significativamente na promoção da saúde animal. Desde então, a OIE, juntamente com membros de países que aprovaram o programa de controle oficial para a Febre Aftosa, vem atualizando as informações referentes a este controle.

As Figuras 6 e 7 mostram o mapa oficial do *status* da Febre Aftosa no mundo até janeiro de 2019 e janeiro de 2020 (última atualização) respectivamente, evidenciando a dinâmica da ocorrência da doença em território global. São mostradas as zonas reconhecidas como livres da doença com vacinação e sem vacinação, áreas em que o *status* da doença foi suspenso, e países onde a distribuição e prevalência da FMD não foram reconhecidos pela OIE. As Figuras 8 e 9 mostram o mapa oficial da América do Sul.



**Figura 6: Mapa oficial do *status* da Febre Aftosa no mundo em janeiro de 2019**

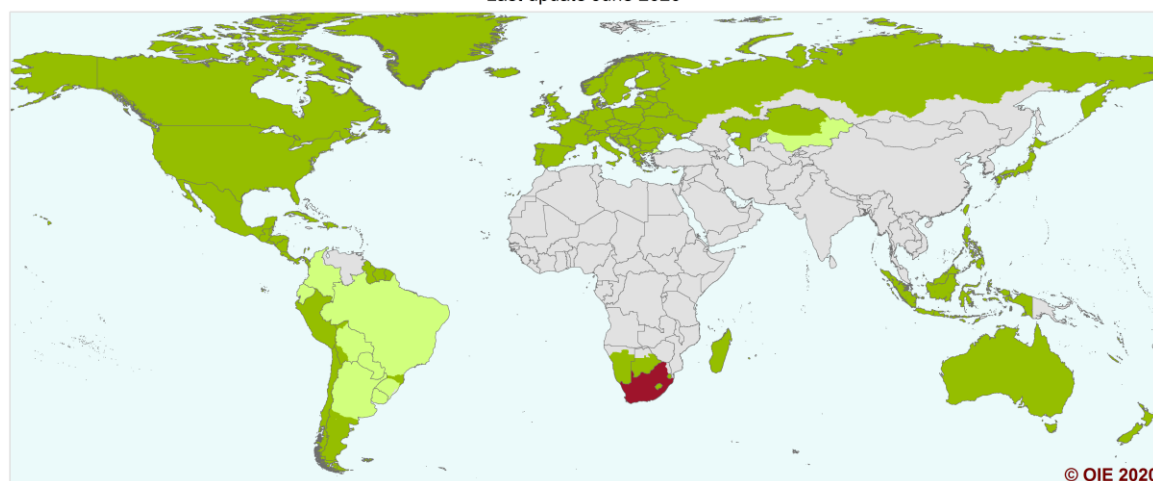






Fonte: WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, [s.d]. (Legenda traduzida para a língua portuguesa).

**Figura 7: Mapa oficial do *status* da Febre Aftosa no mundo: última**

**OIE Members' official FMD status map**

Last update June 2020



- |   |  |   |   |
|---|--|---|---|
|  | Membros e zonas reconhecidos como livre de FMD sem vacinação |  | Suspensão do <i>status</i> de livre de FMD              |
|  | Membros e zonas reconhecidos como livre de FMD com vacinação |  | País e zona sem o <i>status</i> oficial da OIE para FMD |





Fonte: WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, [s.d.]. (Legenda traduzida para a língua portuguesa).

**Figura 8: Mapa oficial do *status* da Febre Aftosa na América do Sul em 2019**

**SOUTH AMERICA: OIE Members' official FMD status map**

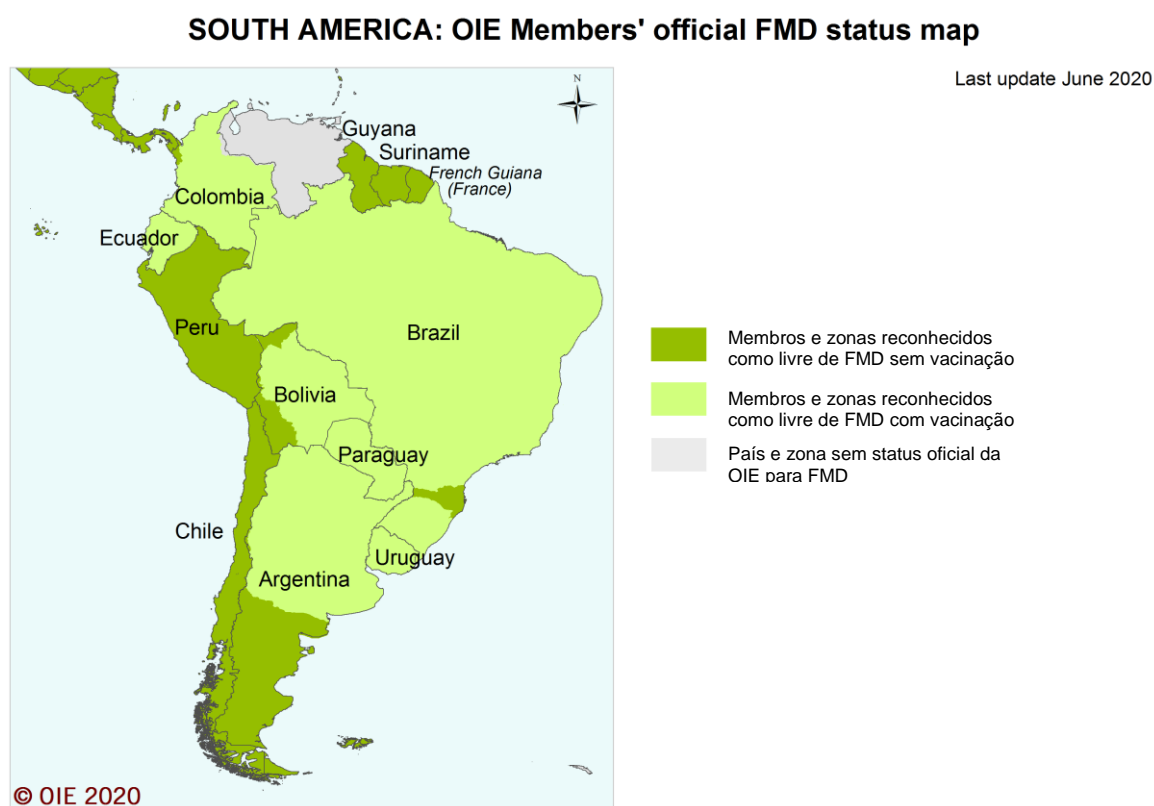
Last update October 2018



- |   |  |
|---|--|
|  | Membros e zonas reconhecidos como livre de FMD sem vacinação |
|  | Membros e zonas reconhecidos como livre de FMD com vacinação |
|  | Suspensão do <i>status</i> de livre de FMD                   |
|  | País e zona sem o <i>status</i> oficial da OIE para FMD      |

Fonte: WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, [s.d.] (Legenda traduzida para a língua portuguesa).

**Figura 9: Mapa oficial do *status* da Febre Aftosa na América do Sul: última atualização**



Fonte: WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, [s.d.] (Legenda traduzida para a língua portuguesa).

De acordo com a Resolução 22 criada em maio de 2018 na *World Assembly of Delegates of the OIE*, que reconhece o *status* da doença da Febre Aftosa dos países membros de acordo com as disposições do Código Sanitário para Animais Terrestres (Código Terrestre), o Brasil possui atualmente o estado de Santa Catarina como zona livre de FMD onde a vacinação não é praticada (documentação de fevereiro de 2007); e as seguintes zonas como zona livre de FMD onde a vacinação é praticada: uma zona cobrindo o território do Estado do Rio Grande do Sul (documentação de setembro de 1997); uma zona composta por duas zonas fundidas designadas pelo Delegado do Brasil em documentos endereçados ao Diretor-Geral em agosto de 2010, setembro de 2017 e setembro de 2019, cobrindo os Estados de Acre, Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Maranhão,

Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rondônia, Roraima, São Paulo, Sergipe, Tocantins e Distrito Federal (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2020b). Contudo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento reconheceu recentemente, por meio da Instrução Normativa nº52 de 11 de agosto de 2020, os Estados do Paraná, Acre, Rio Grande do Sul e Rondônia, e parte dos Estados do Amazonas e Mato Grosso como livres de Febre Aftosa sem vacinação, e aguarda o reconhecimento pela OIE.

O Brasil se mantém sem ocorrência da doença desde abril de 2006 (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2017b), perfazendo quase 15 anos nessa condição sanitária.

### **1.9.2 Programa Nacional de Prevenção e Controle da Febre Aftosa**

Sob a coordenação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e com a participação dos serviços veterinários estaduais e do setor agroprodutivo, o Brasil segue na luta contra a Febre Aftosa em busca de um país livre da enfermidade. O Programa Nacional de Erradicação e Prevenção da Febre Aftosa – PNEFA (Instrução Normativa nº44, de 2 de outubro de 2007) tem como estratégia principal a implantação progressiva e manutenção de zonas livres da doença, de acordo com as diretrizes estabelecidas pela OIE.

A vacinação é adotada em território nacional como medida profilática, e ocorre em todos os estados exceto Santa Catarina (e recentemente, nos estados descritos no item 1.9.1). Há grandes esforços sanitários sendo realizados para a transição de *status* sanitário das “zonas livres de Febre Aftosa com vacinação” para “zonas livres de Febre Aftosa sem vacinação”, de forma regionalizada, com início em 2019 e conclusão prevista para 2023, quando então, todo país alcançaria a condição de “livre de Febre Aftosa sem vacinação”, reconhecida pela OIE.

O PNEFA classificou as regiões fronteiriças brasileiras em relação ao risco de reintrodução da doença no país. A Subregião do Cone Sul (zoneamento que corresponde ao Chile, Argentina, Uruguai, Paraguai, porção oriental da Bolívia e os estados brasileiros de RO, MT, MS, PR, SC e RS) teve último foco de Febre Aftosa registrado em 2011 no Paraguai, com aparição de genótipos do vírus do

subtipo O. À época, medidas de reforços de vigilância foram tomadas, através da melhoria da cobertura da vacinação em animais mais jovens e em subpopulações onde a gestão sanitária era mais distante ou fraca, além de áreas com surtos esporádicos e áreas fronteiriças dos países (NARANJO; COSIVI, 2013).

Testes sorológicos sistemáticos foram implementados para verificar a ausência de transmissão do vírus. Naranjo (2006) aponta para o que denominou de “nicho endêmico” para o FMDV subtipo O nesta região, devido a condições de vulnerabilidade e receptividade dos rebanhos. Apesar disso, o Plano Estratégico 2017-2026 do PNEFA estima que a probabilidade de introdução do vírus da Febre Aftosa pela proximidade geográfica nesta sub-região é classificada como *baixa*, ou seja, considera que a ocorrência do evento é muito improvável, porém ocorre sob certas condições (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2019b).

A porção brasileira que integra a sub-região Amazônica registrou seus últimos focos de Febre Aftosa em 2004, no Amazonas, causado pelo vírus C, e no Pará, pelo vírus O. Estes surtos foram observados após três anos sem ocorrência clínica da doença na área, que apresentava ausência de casos clínicos desde 2001 (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2017b). A última avaliação de risco de reintrodução da doença no país através desta região, consta de março de 2017, quando a última ocorrência de FMD havia sido na Venezuela, em 2013. À época, foi atribuído um fator de probabilidade *muito baixa* (classificação que considera que a ocorrência do evento é muito improvável, mas não pode ser descartada) à esta região, contudo, em outubro de 2018 houve registro de foco de FMD em território Colombiano, conforme relatório da OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2018) e, portanto, o risco precisa ser reavaliado pelos órgãos competentes e divulgados oficialmente.

Como destacado, as últimas ocorrências de surto da doença no continente sul americano têm sido relacionadas ao subtipo O, por isso a escolha desta amostra para desenvolver o presente trabalho.

### 1.10 Avaliação da técnica diagnóstica molecular por RT-qPCR

Um ensaio validado deve ser frequentemente monitorado para garantir que mantém sua adequação ao objetivo por meio da checagem dos resultados dos controles do ensaio incluídos a cada execução, e de avaliação contínua de todas as etapas do processo, durante o uso rotineiro na população alvo (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019b).

De acordo com o Relatório de Validação da técnica de RT-qPCR para detecção do vírus da Febre Aftosa (documento interno do LFDA-MG sob catalogação FOR/LBM/PL/023V.1), os parâmetros analíticos do diagnóstico molecular da doença obtidos à época de sua implementação para a matriz LEF em meio Earle no ano de 2012 foram limite de detecção (LD) igual à diluição correspondente a  $10^{-5}$  de suspensão viral de FMDV (amostra e título viral não reportados no documento); especificidade diagnóstica confirmada pela ausência de amplificação do RNA extraído de 30 bovinos em zona livre de Febre Aftosa; e incerteza expandida (U) de 0,64 *Cycle Threshold* (Ct).

Em 2018, a técnica para diagnóstico do vírus da Febre Aftosa por PCR digital foi desenvolvida e implementada no LFDA-MG (PINHEIRO-DE-OLIVEIRA et al., 2018) utilizando o mesmo alvo de PCR da técnica de rotina (CALLAHAN et al., 2002). O LD estabelecido correspondeu a  $10^{1,4}$  TCID<sub>50</sub>/mL para a amostra FMDV A24 Cruzeiro de título  $10^{6,4}$  TCID<sub>50</sub>/mL.

Kralik e Ricchi (2017) reportam a dificuldade de se determinar parâmetros básicos da qPCR tendo em vista que esta técnica é relativamente atual na aplicação diagnóstica, e que a ausência de procedimentos padrão para a determinação dos parâmetros funcionais básicos da qPCR levou a um cenário em que a padronização de métodos é realizada de acordo com regras distintas, por laboratórios distintos.

No presente trabalho, a proposta de avaliação do desempenho do diagnóstico molecular para FMD em amostras inativadas por dois diferentes reagentes, tomou por base as diretrizes preconizadas pelo Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para Diagnóstico Molecular de Doenças Infecciosas na Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, a partir de agora, referenciado apenas como “Manual de Verificação de Desempenho de Métodos”

(BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2015).

O diagnóstico molecular da FMD no LFDA-MG é semi-quantitativo já que a finalidade maior do ensaio, que está sob os interesses da defesa agropecuária nacional, é a informação da presença ou ausência do vírus no animal em análise.

#### **1.10.1 Limite de Detecção**

A sensibilidade diagnóstica refere-se ao risco de uma reação negativa ocorrer em um ensaio de PCR quando, de fato, um animal está infectado (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, [s.d.]). Os prejuízos advindos desta situação podem ser pressupostos, tendo em vista todo o cenário exposto no presente trabalho até aqui. Segundo Bustin e colaboradores (2009), essa sensibilidade relativa a reações de PCR, é tipicamente expressa como o limite de detecção, que é a concentração passível de ser detectada com razoável segurança (sendo 95% de probabilidade comumente adotada) sob dado procedimento analítico. É apontado ainda que as estimativas de LD nas análises de qPCR são complicadas devido à natureza logarítmica de  $C_t$ , porque  $C_t$  é indefinido quando a concentração do modelo é zero. Sendo assim, a determinação apropriada e modelagem do LD numa qPCR é foco de pesquisa continuada (BUSTIN et al., 2009).

Em consonância com a literatura, o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos tem em conta que o limite de detecção é um dos requisitos básicos para o início do processo de avaliação da metodologia. Ele considera como LD a menor concentração em que um agente é detectado em 100% das tentativas numa triplicata de PCR, resultado este que deve então ser confirmado pela contaminação experimental independente de 21 amostras negativas da matriz biológica em questão, com êxito na amplificação em pelo menos, 20 delas. Fica aqui destacado que, conforme exposto acima, a determinação do LD deve incluir não apenas a capacidade de amplificação de parte do genoma do agente infeccioso, mas também a influência da matriz biológica nesse processo.

Métodos mais sensíveis acabam por ser também mais susceptíveis a interposição de substâncias diversas inerentes à própria amostra ou reagentes,

cujo efeito sobre o resultado final é indesejado. A matriz biológica na qual um analito alvo é encontrado (soro, fezes, tecido, etc.) normalmente é objeto maior desse tipo de preocupação, considerando-se a possibilidade de conter inibidores endógenos ou exógenos que impeçam o funcionamento de alguns ensaios. Tal interferência é especialmente preocupante em ensaios dependentes de enzimas, como é o caso da PCR (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019b).

### 1.10.2 Eficiência da RT-qPCR

Ensaio robustos e precisos de qPCR são geralmente correlacionados com alta eficiência de reação (BUSTIN et al., 2009). Eficiência é a taxa de amplificação da PCR que garante a duplicação da quantidade de cópias do produto da reação a cada ciclo (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2015).

Bustin et al., (2009) define que, idealmente, a eficiência de amplificação da PCR deva ser estabelecida por meio de curvas de calibração replicadas, com estimativa de intervalo de confiança e erro padrão. Svec e colaboradores (2015) relatam métodos alternativos para estabelecer a eficiência de uma reação de PCR, contudo, ratifica que a curva padrão continua sendo a abordagem mais confiável e robusta para estimar a eficiência dos ensaios de PCR, amplamente aceita pela comunidade científica.

O Manual de Verificação de Desempenho de Métodos preconiza a realização de uma curva com no mínimo cinco pontos de concentração, em triplicata. Para o cálculo da eficiência, plota-se um gráfico de regressão linear semilog do valor de  $C_t$  em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico. O parâmetro de avaliação é o coeficiente angular (*slope*) desta curva, que deve ser igual a -3,32 para uma eficiência de 100%. A eficiência de PCR é dada pela fórmula  $10^{-1/slope} - 1$  (BUSTIN et al., 2009). Assim, o valor máximo teórico de 1,00 (ou 100%) indica que a quantidade de produto dobra a cada ciclo.

Os principais fatores influenciadores da eficiência de uma reação de PCR, são relatados na literatura como sendo (I) a sequência e estruturas dos iniciadores e do *template* (região genômica alvo da PCR) (BUSTIN et al., 2009; SVEC et al., 2015), pois a presença de dímeros (subprodutos da reação de PCR) e a oportunidade para interações intramoleculares indesejadas acarreta em



menor eficiência; (II) a matriz da amostra, que pode conter inibidores e outras substâncias interferentes ou transportar agentes de etapas anteriores de processamento (SVEC et al., 2015); além da (III) otimização do protocolo de PCR, visto que qualquer um dos reagentes de PCR pode ser limitador de taxa e desempenho.

O Manual de Verificação de Desempenho de Métodos estabelece como parâmetro desejável uma eficiência entre 0,90 e 1,10 e o coeficiente de determinação –  $R^2$  da curva padrão maior do que 0,99. Tais parâmetros são relativos apenas à etapa da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase, visto que a definição de eficiência no referido Manual é “taxa de amplificação de PCR que garante a duplicação da quantidade de cópias do produto de PCR a cada ciclo”.

### **1.10.3 Repetibilidade e Reprodutibilidade Intralaboratorial**

A precisão de determinada metodologia relaciona-se intimamente com o grau de concordância de medidas sob circunstâncias especificadas, e sua determinação prática requer as condições de repetibilidade e reprodutibilidade (KRALIK; RICCHI, 2017).

A repetibilidade está vinculada também à robustez do ensaio (KRALIK; RICCHI, 2017) e sua verificação é realizada com as mesmas amostras, analisadas repetidamente. De acordo com o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos, as condições de repetibilidade devem incluir ainda, além de mesmas amostras, o mesmo laboratório, mesmo operador, mesmo instrumento de medição, e as medições devem ser realizadas em intervalos de tempos pequenos. A repetibilidade do ensaio diagnóstico por RT-qPCR é avaliada através da triplicata de uma mesma concentração de solução contaminada com o material genético viral. É expressa quantitativamente, em função das características da dispersão dos resultados para a variância de *Ct*. (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2015; KRALIK; RICCHI, 2017).

Reprodutibilidade de ensaio de RT-qPCR, por sua vez, refere-se à variação nos resultados entre corridas ou entre diferentes laboratórios (KRALIK; RICCHI, 2017). Tendo em conta as limitações de uma avaliação de ensaio entre mais de um laboratório, que incluem questões logísticas, técnicas e financeiras,

o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos considera o que nele é denominado “reprodutibilidade intralaboratorial”. Sua definição corresponde ao grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando (analito), em condições variadas para o mesmo método de ensaio, no mesmo laboratório. (A comparação intralaboratorial fica a cargo dos ensaios de proficiência previstos pela NORMA ISO: IEC 17025 na qual o LFDA-MG possui um escopo de acreditação que inclui o diagnóstico molecular para a Febre Aftosa). Os valores associados à repetibilidade e à reprodutibilidade, somados, expressam o erro de medida do mensurando.

Por fim, as medidas de incerteza de um experimento com mensurando quantitativo também são dependentes das análises de repetibilidade e reprodutibilidade tendo em vista serem obtidas levando-se em consideração os critérios referentes à tais parâmetros (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2015).

## 2 Justificativa

A Febre Aftosa tem sido reconhecida como uma das principais restrições ao comércio internacional de animais e de produtos animais. A OIE preconiza o uso do líquido esofágico faríngeo como amostra clínica de escolha para o diagnóstico do FMDV, destacando que esta amostra se mostrou mais adequada inclusive na detecção de animais portadores. Entretanto, esta é uma amostra clínica complexa pelo local e forma como é coletada, e passível de conter inibidores para testes de PCR.

Neste contexto, o diagnóstico laboratorial da doença é uma das etapas a ser mantida em constante aperfeiçoamento e prontidão pelos órgãos oficiais do país, desempenhando papel fundamental e decisivo no âmbito do PNEFA, pois se apresenta como suporte imprescindível à manutenção da vigilância epidemiológica regular, sobretudo, nas investigações de suspeitas e intervenções emergenciais (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2017). Com tal finalidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mantém no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pedro Leopoldo/MG (LFDA-MG) o setor de Diagnóstico Animal (DIA), que realiza diagnósticos de doenças virais e bacterianas, sendo a referência nacional para o diagnóstico molecular da Febre Aftosa. Também são realizados no LFDA-MG, através do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Virais (LDDV/DIA), testes sorológicos para diagnóstico de FMDV e o isolamento viral. Os testes sorológicos são também realizados nas instalações de LFDA dos estados de Pernambuco e Rio Grande do Sul.

Considerando-se os aspectos até aqui apresentados, medidas de prevenção e erradicação da Febre Aftosa são, há décadas, foco de constante aprimoramento, perspassando por desde as políticas públicas de amplo espectro, quanto a estudos pormenorizados e pontuais, como a metodologia diagnóstica da doença. Precisão, rapidez e segurança são alvo de tais aprimoramentos, afim de fornecerem condições para que a manutenção do *status* fitosanitário seja eficiente e que medidas acertadas possam ser tomadas a contento numa possível situação emergencial.

A implementação de metodologia de inativação viral alternativa àquela vigente no LFDA-MG será interessante na medida em que represente uma

opção ao único reagente inativante viral atualmente utilizado. Num possível cenário de sanção comercial que o país venha a sofrer, ela representa uma alternativa de exportação, não ficando as atividades laboratoriais do MAPA, portanto, reféns de um só reagente comercial. Soma-se a este fator, as características tóxicas do TRIzol® frente ao tampão de lise MagMax™ CORE relativamente à sua volatilidade e presença de fenol em sua composição, o colocando em desvantagem tanto no quesito da manipulação pelo operador quanto relativamente à geração de resíduos contaminantes.

Assim, frente ao cenário agropecuário nacional, às potenciais perdas econômicas causadas pela Febre Aftosa que podem culminar em embargos econômicos para a exportação, e ao histórico de ocorrência de surtos no país e em países vizinhos, este projeto justifica-se. Destaca-se que este projeto desenvolvido no Mestrado Profissional em Microbiologia Aplicada do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia da UFMG trabalha uma demanda induzida do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais com sede na cidade de Pedro Leopoldo.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivos gerais**

O presente projeto visa caracterizar de maneira comparativa, a metodologia oficial de diagnóstico da FMD baseado na RT-qPCR segundo a OIE, com variação na etapa de inativação viral, de modo a estabelecer as melhores condições experimentais a serem mantidas/adotadas na rotina, quando da análise da matriz biológica líquido esofágico faríngeo bovino.

#### **3.2 Objetivos específicos**

(I) Verificar a inativação do vírus da Febre Aftosa em líquido esofágico faríngeo bovino em condições de coleta de campo, pelo reagente *MagMAX™ CORE Lysis Solution*;

(II) Verificar o desempenho do método completo de diagnóstico molecular de Febre Aftosa sob tais condições de inativação (baseadas no protocolo para inativação de amostras virais *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit*), em comparação à metodologia de inativação viral e extração de RNA em vigência no LFDA-MG (protocolo *Trizol®*, *Life Technologies*, EUA), frente aos testes de eficiência, sensibilidade, repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial.

### **4 Materiais e Métodos**

#### **4.1 Local de desenvolvimento e amostra viral utilizada**

Devido a sua natureza altamente contagiosa para os animais e a importância econômica da Febre Aftosa, todo o trabalho de laboratório com culturas vivas ou material potencialmente infectado/contaminado foi realizado em nível apropriado de contenção. Seguir os protocolos de biossegurança é fundamental para reduzir o risco de disseminação do vírus para instalações susceptíveis (CHANG et al., 2013). Aqueles países que não têm acesso a instalações de contenção apropriadas, devem enviar amostras para um Laboratório de Referência de Febre Aftosa da OIE. O Laboratório de Referência no Brasil tem escritório no Rio de Janeiro e instalações laboratoriais junto ao LFDA-MG na cidade de Pedro Leopoldo com o qual mantém um acordo

de cooperação técnica. O Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da OIE descreve as normas e requisitos de contenção para a gestão do risco biológico no laboratório veterinário e nas instalações veterinárias para a manipulação do FMDV e de amostras potencialmente contaminadas.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, sede Pedro Leopoldo, nos diferentes Laboratórios do Setor de Diagnóstico Animal (DIA). A manipulação de amostras virais para contaminação experimental de LEF foi executada nas instalações de Nível de Biossegurança 4.

Utilizou-se FMDV mantido como amostra de referência pelo LFDA-MG, correspondente a isolado do surto ocorrido em 1980 no Rio Grande do Sul, discriminada como FMDV O RS BR/80, mantido em cultivo celular em passagens sucessivas desde o seu recebimento no ano de 2017, proveniente do PANAFTOSA. A suspensão viral foi previamente titulada em cultura de células baby hamster kidney (BHK21) e obteve título de  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L.

#### **4.2 Matriz biológica utilizada**

A matriz biológica referente aos experimentos conduzidos correspondeu ao líquido esofágico faríngeo bovino em proporção 1:1 com Meio Earle 2 vezes concentrado, adicionado de antibiótico, e com pH entre 7,4 e 7,6, conforme diretriz do Manual Veterinário de Colheita e Envio de Amostras da Organização Panamericana de Saúde para o armazenamento e transporte de amostras para diagnóstico de doenças de pele e mucosas (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2010).

Para a etapa de inativação viral, a matriz biológica LEF correspondeu a amostra de campo recebida e analisada pelo LFDA-MG em 2019 para diagnóstico de FMDV, cujo resultado por RT-qPCR foi negativo.

Para a etapa de verificação de desempenho dos métodos, a matriz biológica correspondeu a pool de LEF bovino, coletado de 10 animais mestiços mantidos pelo LFDA-MG, de idade variada, do sexo masculino. Os animais ficaram em jejum por 12 horas e ingeriram água imediatamente antes da coleta.

Submeteu-se o material à RT-qPCR para FMDV, cujo resultado foi negativo, bem como à RT-qPCR para o gene constitutivo 18S que indicou amplificação.

### 4.3 Inativação viral e Extração de RNA

Para as amostras inativadas por TRIzol®, foi adotado o protocolo de pipetagem de 400 µL de amostra para 1 mL de TRIzol®, seguida de homogeneização e incubação a temperatura ambiente por no mínimo 15 minutos. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados, procedeu-se à homogeneização em vórtex por aproximadamente 15 segundos, incubação à temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugação a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos (Heraeus Megafuge 16R - Thermo Scientific, Alemanha). A separação das fases orgânica e aquosa permitiu a pipetagem de todo o volume aquoso, porção na qual se encontrava o RNA total. Esta alíquota foi então adicionada ao cartucho de extração Maxwell® 16 LEV, e seguiu para o processamento restante, totalmente automatizado.

Já para as amostras inativadas pela solução de lise MagMAX™ CORE, o procedimento consistiu em 200 µL de amostra tratados com 350 µL de solução de lise MagMAX™ CORE e 10 µL de solução de proteinase K 600 mAU/mL (QIAGEN, Alemanha) que seguiram para agitação em equipamento disruptor de células e tecidos L-BEADER HT (LOCCUS, Brasil) por 2 minutos a 20 Hertz, em substituição à agitação vigorosa em vórtex por 2 minutos seguida de giro a 500 x g por 10 segundos, preconizadas no protocolo original da *ThermoFisher Scientific*. Tal adaptação ocorreu para viabilizar a aplicabilidade do mesmo à rotina do LFDA-MG, uma vez que para proceder à agitação em vórtex seria necessário submeter as amostras uma a uma, enquanto a capacidade amostral do disruptor de células é de 48 microtubos por vez. Após a agitação, as amostras foram incubadas por no mínimo 8 minutos à temperatura ambiente. Todo o volume de amostra foi então aliquotado para o cartucho de extração Maxwell® 16 LEV, e seguiu para o processamento restante, totalmente automatizado.

Além da adaptação acima reportada, os testes foram conduzidos com a matriz biológica LEF, não contemplada no escopo apresentado pela *ThermoFisher Scientific*, que abrange sangue, soro, suabe, sobrenadante de fragmento de orelha, leite integral, plasma sanguíneo, cultura InPouch® TF, e tecido homogeneizado.

Relativamente a ambos os métodos de inativação, quando não foi possível seguir com o fluxo de análise logo após o processamento, as amostras foram armazenadas em condição de congelamento a -70°C (Forma™ 88000

Series - Thermo Scientific, EUA). Posteriormente foram retiradas do freezer, descongeladas à temperatura ambiente e homogeneizadas para uso.

O kit de extração automática de ácidos nucléicos utilizado foi o *Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit* (Promega, EUA) e o equipamento, o *Maxwell® 16 Instrument MDx* (Promega, EUA), que tem por princípio a purificação de ácidos nucléicos através de sua afinidade a esferas (*beads*) paramagnéticas e subsequentes lavagens em tampões diversos, com eluição final em 50 µL de água livre de nucleases. Este kit prevê processamento inicial da amostra por tampão de lise e proteinase K a 56°C cuja finalidade é a remoção do revestimento protéico viral e inativação de RNases (*MAXWELL® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit*, [s.d.]). Estes passos de processamento inicial, entretanto, foram substituídos pelos procedimentos de inativação adotados neste trabalho.

Uma vez extraído, o RNA suspenso em água livre de nucleases foi imediatamente aplicado em reação de RT-qPCR e posteriormente armazenado a -70°C (*Forma™ 88000 Series* - Thermo Scientific, EUA).



#### 4.4 RT-qPCR

O material obtido das etapas de inativação e extração de ácidos nucleicos foi submetido à transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real de passo único, tendo como região alvo o gene 3D do genoma do FMDV, que codifica para a RNA polimerase viral (CALLAHAN et al., 2002), e cujo *amplicon* é de 107 pares de base (pb) (Tabela 1). Esta reação é a indicada pelo Instituto *Pirbright* (WRLFMD), e utiliza a tecnologia de sonda *TaqMan* para a detecção do alvo. Utilizou-se como molde, 2 µL de RNA em 22 µL de mix de reação, e foi operado o sistema de amplificação e detecção CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA).

Utilizou-se para a RT-qPCR o kit comercial *Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha). Ao tampão (*buffer*) de reação, foram adicionados os iniciadores e sonda específicos, a enzima transcriptase reversa fornecida pelo kit e água livre de nucleases até um volume total de 20 µL (Tabela 2). Foram adicionados 2 µL de RNA total extraído das amostras contaminadas experimentalmente, e seguiu-se o ciclo para amplificação (Tabela 4) em conformidade com as recomendações do fabricante e com os protocolos já validados no LFDA-MG.

Paralelamente, foi utilizada a RT-qPCR para detecção do gene do RNA estrutural 18S rRNA (SABATINI et al., 2013) que serviu como gene normalizador para as análises (Tabela 1). A reação foi constituída pelos mesmos reagentes descritos para a detecção do FMDV, com exceção dos iniciadores e sonda, que foram específicos para 18S rRNA. Ao volume total de 11,5 µL foi adicionado 1 µL de RNA total extraído das amostras contaminadas. A PCR foi submetida a seu respectivo ciclo de amplificação (Tabela 3) no termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA).

Foram consideradas negativas amostras onde não houve amplificação (valor de *Ct* não determinado), e positivas, aquelas em que houve determinação de *Ct* e curva de amplificação caracterísitca. No caso de suspensões virais que não apresentaram curva de amplificação em etapa do desenvolvimento deste trabalho que requeriu análise estatística, convencionou-se adotar o valor de *Ct* igual a 40.

Tabela 1: Oligonucleotídeos das RT-qPCR para FMDV e gene constitutivo

PCR	Primer F	Primer R	Sonda	Região Alvo	Tamanho Esperado (pb)
FMDV alvo 3Dpol	5' – ACTGGGTTTTACAAA CCTGTGA - 3'	5' -GCGAGTCCTGCC ACGGA - 3'	5' – TCCTTTGCACGCAC - 3'	3D	107
18s rRNA	5' - GAGACTCTGGCATGC TAACTAG - 3'	5' – GGACATCTAAGGGCA TCACAG – 3'	5' – TGCTCAATCTCGGGT GGCTGAA – 3'	18S rRNA	128

Tabela 2: Insumos da RT-qPCR para FMDV – kit QuantiFast

Insumo	Volume para 1 reação (µL)
Água livre de nucleases	6,25
2X QuantiFast Probe RT-PCR Master Mix	12,5
Iniciadores F e R / Sonda - FAM (20 µmol/µL)	1
QuantiFast RT Mix	0,25
Total	20

Tabela 3: Insumos da RT-qPCR para gene constitutivo – kit QuantiFast

Insumo	Volume para 1 reação (µL)
Água livre de nucleases	3,625
2X QuantiFast Probe RT-PCR Master Mix	6,25
Iniciadores F (10 µmol/µL)	0,5
Iniciadores R (10 µmol/µL)	0,5
Sonda- FAM (10 µmol/µL)	0,5
QuantiFast RT Mix	0,125
Total	11,5

Tabela 4: Ciclagem das RT-qPCR para FMDV e gene constitutivo – kit QuantiFast

Fase	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos	Detecção
1	50°C	10 min	1	----
	95°C	5 min		----
2	95°C	15 s	45	----
	60°C	1 min		ON-FAM

Apenas para a avaliação da reprodutibilidade intralaboratorial, variaram-se o kit comercial para a RT-qPCR e o equipamento termociclador, conforme descrito no item 4.6.2.

#### **4.5 Teste de inativação viral por protocolo *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit Protocol for Inactivation of Viral Samples* (ThermoFisher™) adaptado**

Os itens a seguir descrevem as etapas de avaliação da eficácia do inativante viral em teste.

##### **4.5.1 Avaliação de efeito citopático**

A inativação viral foi avaliada através do isolamento viral. Após inoculação do FMDV O RS BR/80  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L em cultivo celular (ver condições no item 4.5.1.3), rotação da placa para homogeneização, e incubação em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> Forma™ Series II 3110 Water Jacket (Thermo Scientific, EUA) a 37°C por 48 horas, a presença ou ausência de ECP foi observada com o uso do microscópio invertido de campo claro Diavert (LEITZ, Alemanha) em aumento de 40 vezes.

Para os poços da placa de cultivo celular nos quais não foi observado o ECP, procedeu-se à segunda e terceira passagens em células sob as mesmas condições acima descritas.

##### **4.5.1.1 Supressão do efeito citotóxico dos reagentes à cultura celular**

Para contornar a toxicidade do tampão de lise às células, foram realizadas diluições do mesmo, a fim de determinar aquela na qual o efeito citotóxico não seria mais observado. Os resultados de inativação viral foram então considerados apenas nas diluições a partir das quais não se observou mais a presença de efeito citotóxico.

Os testes foram conduzidos tanto com Meio Essencial Mínimo (MEM) quanto com matriz biológica LEF contaminados experimentalmente.

##### **4.5.1.2 Preparo das Soluções de Trabalho**

As Soluções de Trabalho (Tabela 5) foram preparadas em triplicata (I, II e III).

Tabela 5. **Componentes das Soluções de Trabalho para teste de inativação viral por MagMAX™ CORE Lysis Solution (µL)**

	A	E	B	C	D	F
FMDV 10 <sup>5,8</sup> TCID <sub>50</sub> /50 µL	-	-	100	100	100	100
Matriz biológica LEF	-	100	-	-	100	100
MagMAX™ CORE Lysis solution	350	-	-	350	350	-
Proteinase K	10	-	-	10	10	-
MEM	200	460	460	100	-	360
Tratamento de inativação	n	n	n	s	s	n
Volume total	560	560	560	560	560	560
Objetivo	Avaliação de citotoxicidade		Avaliação de ECP			

“n” indica não; “s” indica sim;

A Solução de Trabalho A objetivou a avaliação do efeito de toxicidade dos reagentes para células BHK21. **Solução de Trabalho A:** preparada em triplicata (I, II e III) pela adição de 10 µL de Proteinase K a 350 µL de MagMAX™ CORE Lysis solution e 200 µL de Meio Essencial Mínimo (MEM).

A Solução de Trabalho E por sua vez, avaliou o efeito de toxicidade da matriz biológica. **Solução de Trabalho E:** preparada em triplicata (I, II e III) a partir de 95 µL de matriz biológica LEF:Earle (1:1) adicionados de 5 µL de antibiótico (conforme previsto para as amostras de campo de LEF que dão entrada no LFDA-MG) e de 460 µL de MEM.

As Soluções de Trabalho B, C e D tiveram por objetivo a avaliação do ECP do FMDV em células BHK21. **Solução de Trabalho B:** preparada em triplicata (I, II e III) pela adição de 100 µL de FMDV a 460 µL de MEM. Esta solução de trabalho foi usada na avaliação do efeito citopático da partícula viral infecciosa em cultivo celular; **Solução de Trabalho C:** preparada em triplicata (I, II e III) pela adição de 100 µL de FMDV a 100 µL de MEM, seguidos de 350 µL MagMAX™ CORE Lysis solution e 10 µL de Proteinase K. Esta solução de trabalho foi usada para isolamento viral em BHK21, avaliado pelo efeito citopático do **FMDV tratado pelo protocolo de inativação em teste**; **Solução de Trabalho D:** preparada em triplicata (I, II e III) por contaminação de 100 µL de matriz biológica LEF com 100 µL de FMDV, seguidos de adição de 350 µL de MagMAX™ CORE Lysis solution e 10 µL de Proteinase K. Esta solução de

trabalho foi usada para isolamento viral em BHK21, avaliado pelo efeito citopático do **FMDV tratado por protocolo de inativação, em teste**.

Porfim, para avaliação de inibição à taxa de multiplicação viral que a matriz biológica LEF pode potencialmente oferecer, a **Solução de Trabalho F** foi preparada em triplicata (I, II e III) a partir da contaminação experimental de 100 µL de matriz biológica LEF com 100 µL de FMDV, acrescidas de 360 µL de MEM.

Apenas as soluções de trabalho C e D foram testadas quanto à capacidade de inativação viral.

O quadro 4 correlaciona as respectivas diluições das Soluções de Trabalho e concentração viral teórica (esperada de acordo com a diluição) em TCID<sub>50</sub>/50µL nas diversas etapas de processamento, descritas na sequência.

**Quadro 4. Testes de inativação viral: preparo das suspensões virais e respectivos títulos virais teóricos (TCID<sub>50</sub>/50µL)**

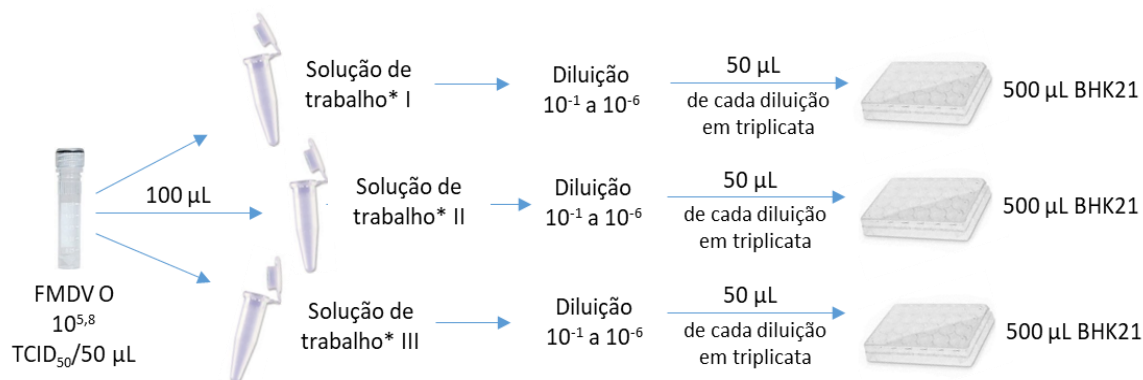
Suspensão Viral Original	Etapa I		Etapa II			Etapa III		Etapa IV	
	Fator de diluição	Solução de Trabalho	Fator de diluição	Diluições da Solução de Trabalho		Fator de diluição	Inoculação em BHK21	Extração do RNA	Trizol
				Nome	TCID <sub>50</sub> /50µL				
TCID <sub>50</sub> /50µL		TCID <sub>50</sub> /50µL							TCID <sub>50</sub> /50µL
10 <sup>5,8</sup>	5,6	10 <sup>5,05</sup>	10	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>4,05</sup>	11 (50µL em 500µL de BHK21)	10 <sup>3,01</sup>	(400µL para extração, ressuspensados em 50µL de água)	10 <sup>3,91</sup>
			10 <sup>2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>3,05</sup>		10 <sup>2,01</sup>		10 <sup>2,91</sup>
			10 <sup>3</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>2,05</sup>		10 <sup>1,01</sup>		10 <sup>1,91</sup>
			10 <sup>4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>1,05</sup>		10 <sup>0,01</sup>		10 <sup>0,91</sup>
			10 <sup>5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>0,05</sup>		10 <sup>-0,99</sup>		10 <sup>-0,09</sup>
			10 <sup>6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-0,95</sup>		10 <sup>-1,99</sup>		10 <sup>-1,09</sup>

#### Fonte: Da autora.4.5.1.3 Cultivo celular

Cada triplicata das Soluções de Trabalho A, B, C, D, E e F foi diluída em série de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>. O volume de 50 µL de cada uma das diluições foram inoculados em monocamada celular crescida em placa de cultivo celular Costar® 3524 (CORNING®, EUA). Cada poço da placa foi preparado com 500 µL de suspensão de células da linhagem BHK21 suplementada com 2% de soro fetal bovino e 300.000 células/mL. Incubou-se em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> Forma™ Series II 3110 Water Jacket (Thermo Scientific, EUA) a 37°C, por 48h.

A Figura 10 ilustra o fluxo geral de trabalho desde o preparo da Solução de Trabalho B, C, D e F até inoculação em cultivo celular. As Soluções de Trabalho A e E diferem apenas pelo fato de não receberem a contaminação com a amostra viral de FMDV.

**Figura 10. Fluxo geral de trabalho para teste de inativação viral**



Fonte: Da autora.

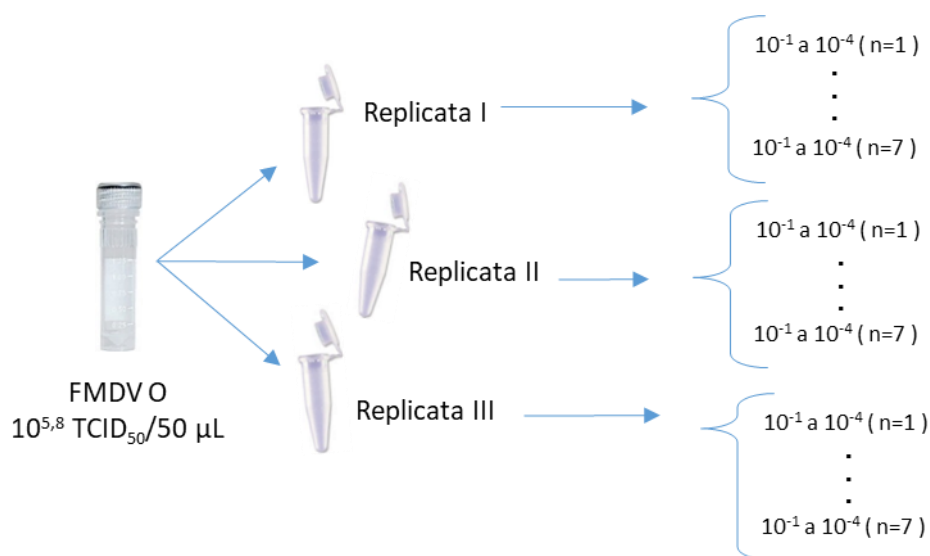
As Soluções de Trabalho correspondem à suspensão viral original diluída 5,6 vezes. I, II e III correspondem a triplicatas. \*Solução de Trabalho B. 100 µL FMDV + 460 µL MEM sem tratamento de inativação viral; Solução de Trabalho C. 100 µL FMDV + 100 µL MEM + 350 µL *MagMAX™ CORE Lysis solution* + 10 µL *Proteinase K* para inativação viral; Solução de Trabalho D. 100µL FMDV + 100 µL matriz + 350 µL *MagMAX™ CORE Lysis solution* + 10 µL *Proteinase K* para inativação viral pelo *MagMAX™ CORE*. (Nas Soluções de Trabalho A e E, os 100 µL FMDV foram substituídos por MEM).

#### 4.5.2 Repetição do teste de inativação viral

Tendo-se em conta a gerência dos riscos relativos à biocontenção do vírus da Febre Aftosa, procedeu-se a um ensaio de repetição do experimento, configurando num teste de reprodutibilidade, tendo em vista que foram preparadas novas contaminações virais. Contudo, para que não se confunda com a reprodutibilidade intralaboratorial da técnica diagnóstica como um todo (processos de inativação + extração de RNA + aplicação em RT-qPCR), que foi objeto de comparação deste projeto, adotou-se a terminologia “Repetição” para a presente etapa de reprodução do teste de inativação viral. Para tanto, foram preparadas 21 replicatas biológicas da Solução de Trabalho D nas concentrações onde foi observada ação eficaz da inativação viral, da forma

descrita a seguir. Três replicatas independentes (I, II e III) foram obtidas pela diluição da amostra viral original FMDV O RS BR/80 ( $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/50  $\mu$ L) de 5,6 vezes, conforme Quadro 4. A partir de cada uma delas, prepararam-se sete replicatas de diluição seriada na base 10, até  $10^{-4}$ , totalizando 21 repetições, conforme Figura 11. As replicatas foram inoculadas em células BHK21 e incubadas conforme descrito no ítem 4.5.1.3. O ECP foi avaliado em uma passagem celular.

**Figura 11. Preparo das 21 repetições das Soluções de Trabalho D nas diluições cuja inativação viral foi confirmada**



Fonte: Da autora. Replicatas I, II e III são constituídas, cada uma, de 100  $\mu$ L de amostra viral + 100  $\mu$ L de matriz + 350  $\mu$ L MagMAX™ CORE Lysis solution + 10  $\mu$ L Proteinase K.

#### 4.5.3 Confirmação da presença do genoma viral por RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada nas diluições da Solução de Trabalho D (matriz biológica LEF contaminada experimentalmente com FMDV) da repetição do experimento. Essa etapa foi adotada para a comprovação da presença de material genético do vírus nos poços da placa de cultivo celular em que ECP não foi observado após processo de inativação em teste.

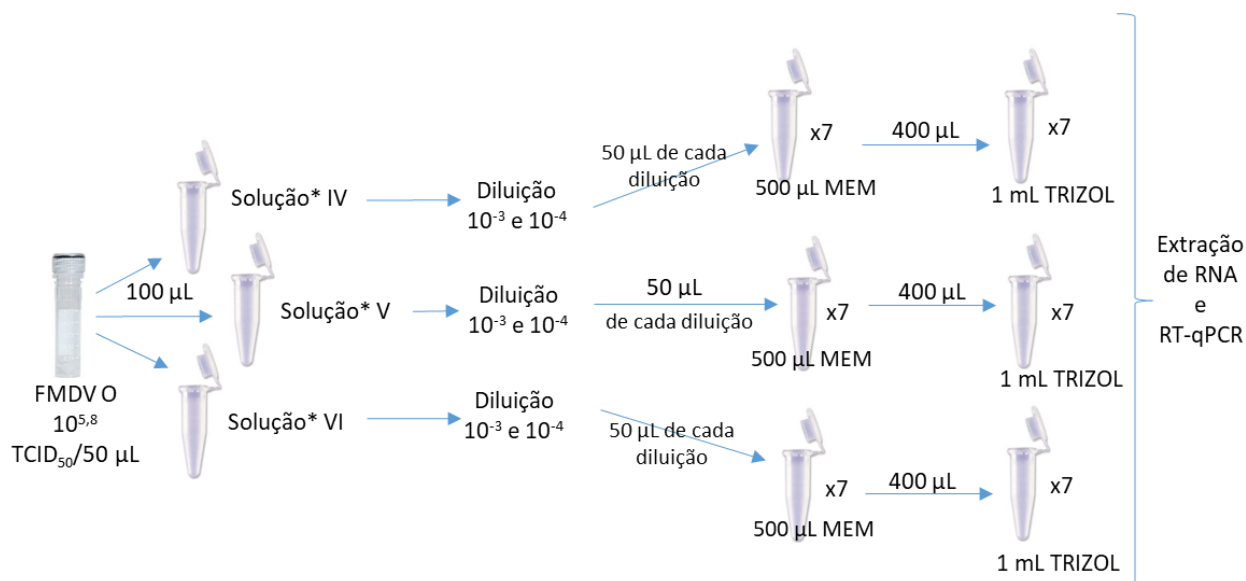
Assim, da placa de cultivo celular inoculada com as 21 réplicas da Solução de Trabalho D nas diluições que responderam positivamente à inativação viral por *MagMAX™ CORE Lysis Solution*, foram pipetados 400  $\mu$ L de cada poço e transferidos para 1 mL de Trizol® (adequação ao protocolo atual do LFDA-MG que prevê o tratamento obrigatório por TRIZOL®, de qualquer amostra

que contenha ou seja suspeita de conter o vírus da Febre Aftosa, uma vez que seja necessária sua retirada do nível de biocontenção máxima). Dessa forma, as diluições virais em questão foram submetidas ao processo de extração de RNA e RT-qPCR em laboratório nível de biossegurança 1.

Comparativamente, foram preparadas também, suspensões virais não submetidas ao protocolo de inativação em teste, de forma a padronizar a condição de diluição total do vírus àquela utilizada para o vírus inativado por *MagMAX™ CORE* e plaqueado. As Soluções IV, V e VI representam triplicatas de 100 µL da amostra viral, adicionados a 100 µL de matriz, e MEM q.s.p. 560 µL. A partir das Soluções IV, V e VI foram preparadas as mesmas concentrações utilizadas no teste de repetição da inativação viral. Foram pipetados 50 µL destas, para 500 µL de MEM para equiparar ao processo de inoculação da suspensão viral em células. Finalmente, 400 µL das mesmas, foram transferidos para 1 mL de TRizol®. A Figura 12 ilustra o preparo das diluições virais não submetidas ao tratamento de inativação viral em teste, normalizando as condições de diluição do vírus, àquelas utilizadas nas amostras inativadas e plaqueadas.



**Figura 12. Preparo das suspensões virais para RT-qPCR não tratadas por processo de inativação viral em teste.**



Fonte: Da autora. \*Solução IV, V e VI são replicatas de: 100 µL FMDV + 100 µL matriz + 360 µL de MEM

Os dois grupos de amostras (tratadas e não tratadas por *MagMAX™ CORE*) foram submetidos à extração de RNA pelo método do TRIZOL®, seguida da RT-qPCR conforme descrito no item 4.4.

Destaca-se que neste momento do desenvolvimento das análises (item 4.5 Teste de inativação viral), as amostras experimentalmente contaminadas saíram do nível de Biossegurança 4 sempre tratadas por TRIZOL®, independente do tratamento por *MagMAX™ CORE Lysis Solution*. Uma vez superada tal fase, foi obtida autorização do setor de Biossegurança do LFDA-MG para a retirada das amostras tratadas apenas com o protocolo *MagMAX™ CORE*.

#### **4.6 Avaliação de desempenho dos métodos variando o tratamento de inativação viral (TRizol® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution)**

Para a avaliação de desempenho dos métodos, duas séries de experimentos foram realizadas: uma seguindo o protocolo adotado atualmente no LFDA-MG de inativação viral por TRizol®, e outra, seguindo o protocolo de inativação em teste (por tampão de lise *MagMAX™ CORE*). Para ambos os casos, foram avaliados os parâmetros limite de detecção, repetibilidade e Reprodutibilidade intralaboratorial (que contemplaram a eficiência da RT-qPCR, a robustez, o efeito matriz) e a incerteza do método.

##### **4.6.1 Limite de detecção, eficiência da RT-qPCR e efeito matriz**

O limite de detecção da RT-qPCR foi avaliado em meio MEM e em matriz biológica LEF para cada tratamento de inativação viral, a partir da contaminação experimental com o vírus da Febre Aftosa subtipo O (amostra RS BR/80 a  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/50 µL), de forma a obter após os processos de inativação e extração de ácidos nucleicos, as seguintes concentrações em TCID<sub>50</sub>/50 µL:  $10^{4,1}$ ;  $10^{3,1}$ ;  $10^{2,8}$ ;  $10^{2,1}$ ;  $10^{1,8}$ ;  $10^{1,7}$ ;  $10^{1,1}$ . Tais concentrações foram determinadas seguindo o critério de preparar pelo menos cinco pontos de concentração para o cálculo da eficiência da PCR (previsto no Manual de Verificação de Desempenho de Métodos), e em virtude da improvável detecção de concentrações mais baixas do que estas. Os dados das RT-qPCR obtidos na etapa descrita em 4.5.3 determinaram a faixa de concentração detectável pela técnica.

Cada um dos pontos de concentração foi extraído e aplicado em RT-qPCR em triplicata. O ponto de concentração mais baixa em que houve amplificação da triplicata foi considerado o LD. Para a confirmação, procedeu-se à contaminação de 21 amostras de matriz biológica LEF a partir do preparo de uma suspensão viral. Quando não foi atingido mínimo de 20 amplificações em 21, a confirmação foi realizada no ponto de concentração logo acima até que este critério fosse atendido.

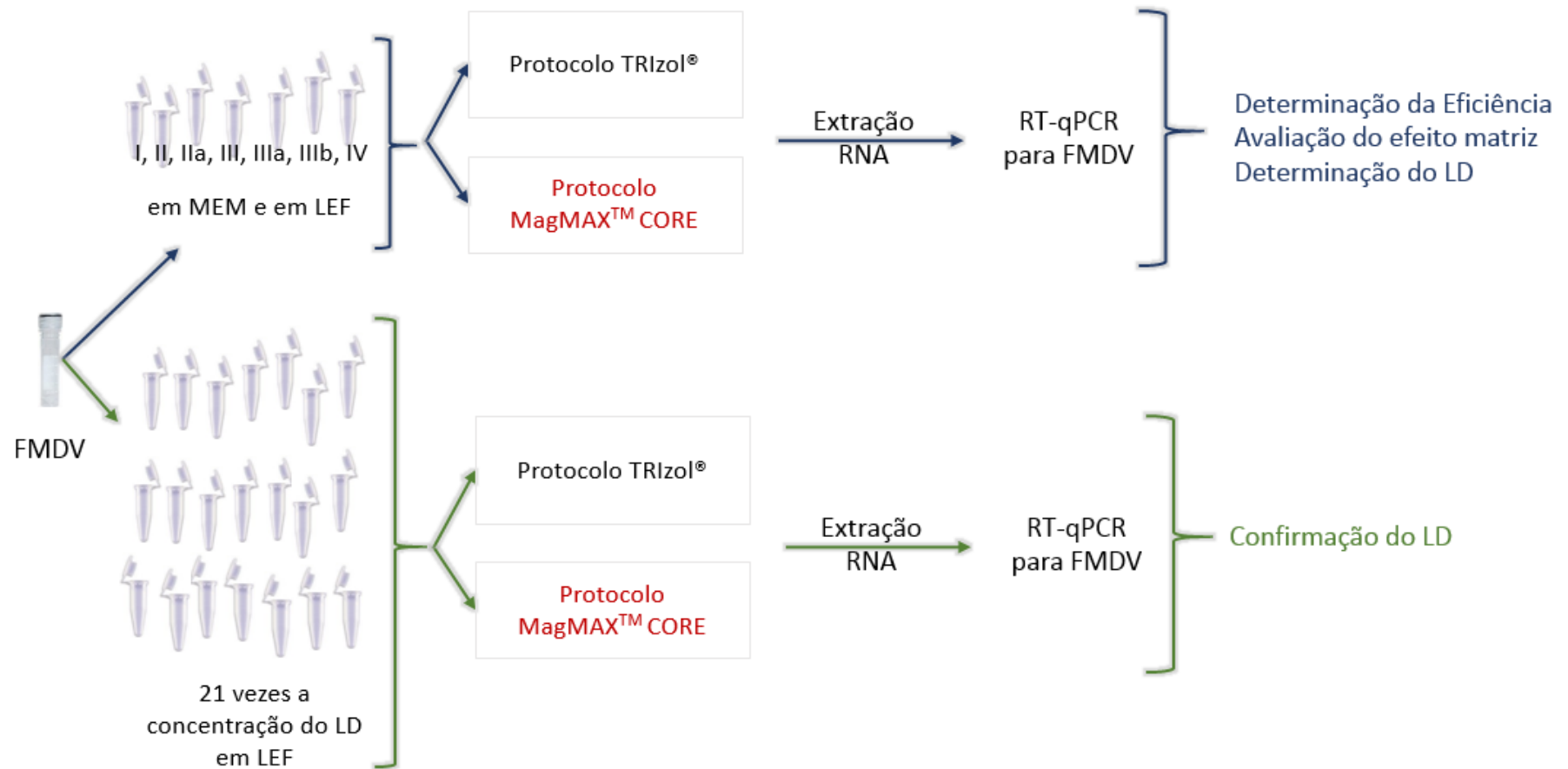
Concomitantemente à determinação do limite de detecção do método, foi calculada a eficiência da reação da RT-qPCR através da determinação do coeficiente angular da curva padrão, e realizada a avaliação do efeito matriz através da comparação entre as curvas na presença e ausência da matriz biológica. A figura 13 ilustra estas etapas.

**Figura 13. Fluxo de trabalho para determinação do limite de detecção e eficiência da RT-qPCR, e avaliação do efeito matriz.**

ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO

1º - Determinação da Eficiência, Avaliação do efeito matriz e Determinação do LD

2º - **Confirmação do LD**



Fonte: Da autora.

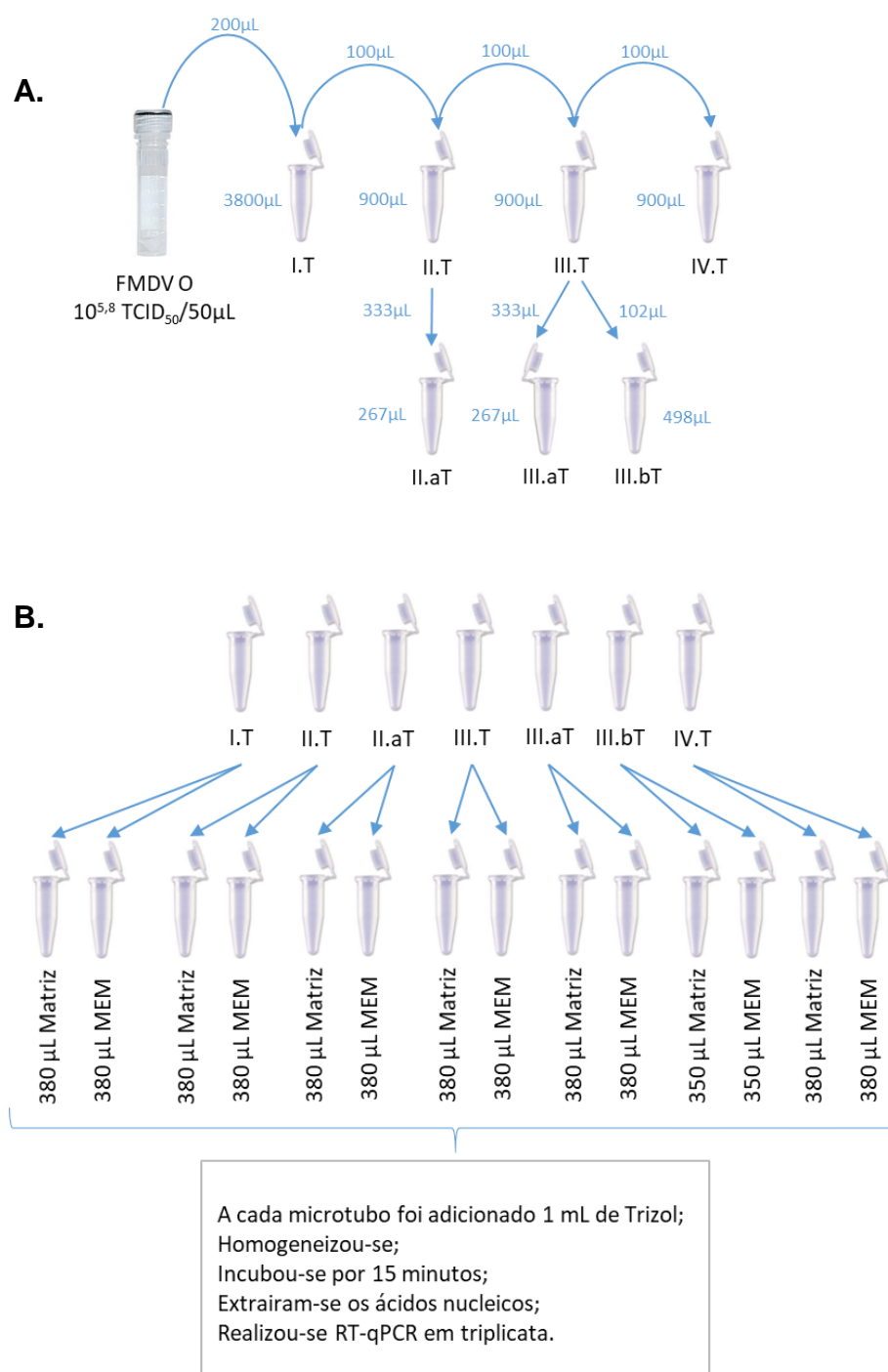
A tabela 6 mostra a carga viral teórica após a eluição dos ácidos nucleicos no processo de extração do material genético.

**Tabela 6. Título viral teórico (TCID<sub>50</sub>/50µL) obtido após a extração de ácidos nucleicos para as etapas de determinação do limite de detecção, eficiência da RT-qPCR e efeito matriz**

Nome da suspensão viral	Proveniente do poço da placa de cultivo celular		Suspensão viral para teste do LD						
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	I	II	Ila	III	IIIa	IIIb	IV
<b>Título viral após a extração do RNA (TCID<sub>50</sub>/50µL)</b>	10 <sup>1,91</sup>	10 <sup>0,91</sup>	10 <sup>4,1</sup>	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>2,1</sup>	10 <sup>1,8</sup>	10 <sup>1,7</sup>	10 <sup>1,1</sup>

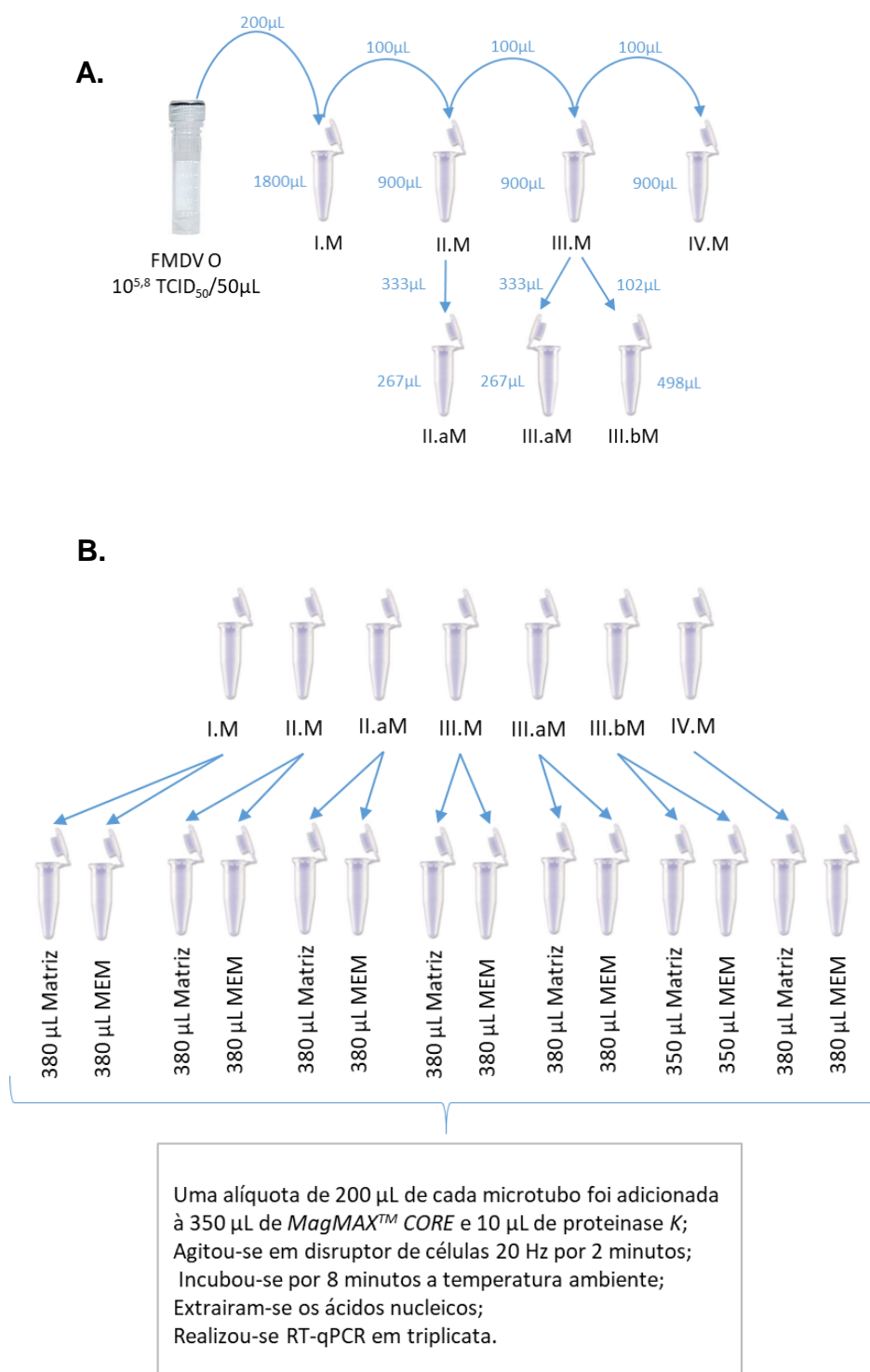
A normalização da carga viral para ambos os métodos de inativação foi realizada para que se mantivesse a fidelidade aos protocolos já estabelecidos, em relação a todas as etapas e volumes utilizados (Extração de RNA pelo método do TRIzol® - Documento interno do LFDA-MG sob catalogação IP/LDDV/PL/039 V.1; e *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit Protocol for Inactivation of Viral Samples* adaptado conforme descrito no item 4.3). Dessa forma, o produto da extração de ácidos nucleicos continha a mesma carga viral teórica para ambos os inativantes virais empregados. As Figuras 14 e 15 em conjunto com o Quadro 5 mostram os processos realizados e as respectivas cargas virais teóricas das soluções.

**Figura 14. Preparo das suspensões virais sob inativação por TRIzol® para determinação do limite de detecção.**



Fonte: Da autora. A. Preparo das suspensões I.T a IV.T. B. 20 µL foram adicionados a 380 µL da matriz biológica LEF e de MEM, exceto para o ponto de concentração III.bT onde a contaminação se deu por adição de 50 µL a 350 µL de matriz biológica LEF e de MEM.

**Figura 15. Preparo das suspensões virais sob inativação por MagMAX™ CORE Lysis Solution para determinação do limite de detecção**



Fonte: Da autora. A. Preparo das suspensões I.T a IV.T. B. 20 µL foram adicionados a 380 µL da matriz biológica LEF e de MEM, exceto para o ponto de concentração III.bT onde a contaminação se deu por adição de 50 µL a 350 µL de matriz biológica LEF e de MEM.

**Quadro 5. Normalização da carga viral relativa aos distintos processos de inativação viral por TRIzol® e por MagMAX™ CORE Lysis Solution e à extração de ácidos nucleicos**

Solução de partida	Inativação por TRIzol®						Inativação por MagMAX™ CORE Lysis Solution								
	Fator de diluição	Suspensão viral obtida			Carga viral adicionada à Matriz e ao MEM (TCID50)	Seguiu p/ inativação viral em 1mL de Trizol; e p/ extração de RNA		Fator de diluição	Suspensão viral obtida			Matriz e MEM contaminados		Seguiu p/ inativação viral em 350µL de MagMax CORE + 10µL Proteinase K; e p/ extração de RNA	
		Nome	Carga viral TCID50	Concentração TCID50/µL		Alíquota	Carga viral TCID50		Nome	Carga viral TCID50	Concentração TCID50/µL	Carga viral TCID50	Concentração TCID50/µL	Alíquota	Carga viral TCID50
Suspensão viral original	20	I T	10 <sup>6,4</sup>	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>4,1</sup>	400 µL	10 <sup>4,1</sup>	10	I M	10 <sup>6,4</sup>	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>4,4</sup>	10 <sup>1,8</sup>	200 µL	10 <sup>4,1</sup>
Suspensão I T / I M	10	II T	10 <sup>4,8</sup>	10 <sup>1,8</sup>	10 <sup>3,1</sup>		10 <sup>3,1</sup>	10	II M	10 <sup>5,1</sup>	10 <sup>2,1</sup>	10 <sup>3,4</sup>	10 <sup>0,8</sup>		10 <sup>3,1</sup>
Suspensão II T / II M	1,8	II.a T	10 <sup>4,3</sup>	10 <sup>1,5</sup>	10 <sup>2,8</sup>		10 <sup>2,8</sup>	1,8	II.a M	10 <sup>4,6</sup>	10 <sup>1,8</sup>	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>0,5</sup>		10 <sup>2,8</sup>
	10	III T	10 <sup>3,8</sup>	10 <sup>0,8</sup>	10 <sup>2,1</sup>		10 <sup>2,1</sup>	10	III M	10 <sup>4,1</sup>	10 <sup>1,1</sup>	10 <sup>2,4</sup>	10 <sup>-0,2</sup>		10 <sup>2,1</sup>
Suspensão III T / III M	1,8	III.a T	10 <sup>3,3</sup>	10 <sup>0,5</sup>	10 <sup>1,8</sup>		10 <sup>1,8</sup>	1,8	III.a M	10 <sup>3,6</sup>	10 <sup>0,8</sup>	10 <sup>2,1</sup>	10 <sup>-0,5</sup>		10 <sup>1,8</sup>
	5,8	III.b T	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>0,0</sup>	10 <sup>1,7</sup>		10 <sup>1,7</sup>	5,8	III.b M	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>0,3</sup>	10 <sup>2,0</sup>	10 <sup>-0,6</sup>		10 <sup>1,7</sup>
	10	IV T	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>-0,2</sup>	10 <sup>1,1</sup>		10 <sup>1,1</sup>	10	IV M	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>0,1</sup>	10 <sup>1,4</sup>	10 <sup>-1,2</sup>		10 <sup>1,1</sup>

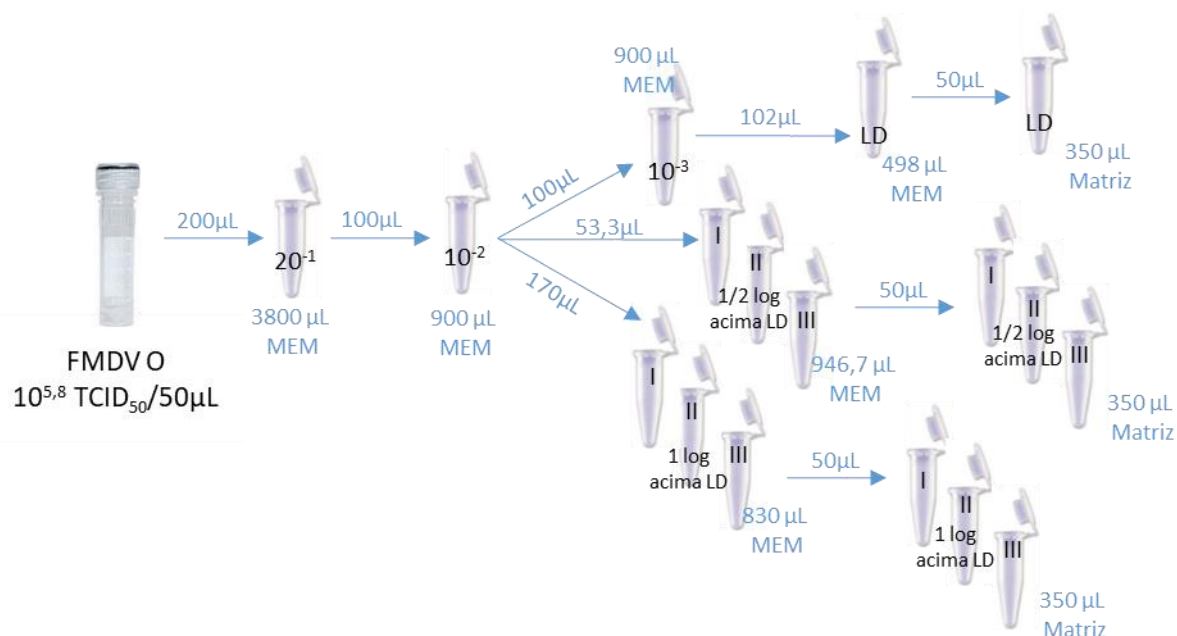
Fonte: Da autora.

#### 4.6.2 Repetibilidade e Reprodutibilidade intralaboratorial

A verificação de desempenho dos métodos diagnósticos (que tiveram por variável o processo de inativação viral) foi realizada com base nas diretrizes do Manual de Verificação de Desempenho de Métodos para medida quantitativa. A terminologia empregada no referido Manual, para “mensurando quantitativo”, é relativa a análises em que utiliza-se o *Ct* medido nos ensaios de qPCR, seja para quantificação do material genético, ou não. As metodologias diagnósticas de interesse da Rede LFDA requerem resultados apenas semi-quantitativos, ou seja, relatados como “presença” ou “ausência” do vírus baseada em valores de *Ct*.

A matriz biológica LEF foi experimentalmente contaminada com a amostra viral (FMDV O RS BR/80  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/50μL) para que se obtivesse ao final dos processos de inativação e extração, as concentrações no LD, ½ log acima do LD e 1 log acima do LD. Para tanto, seguiram-se os passos representados nas Figuras 16 e 17.

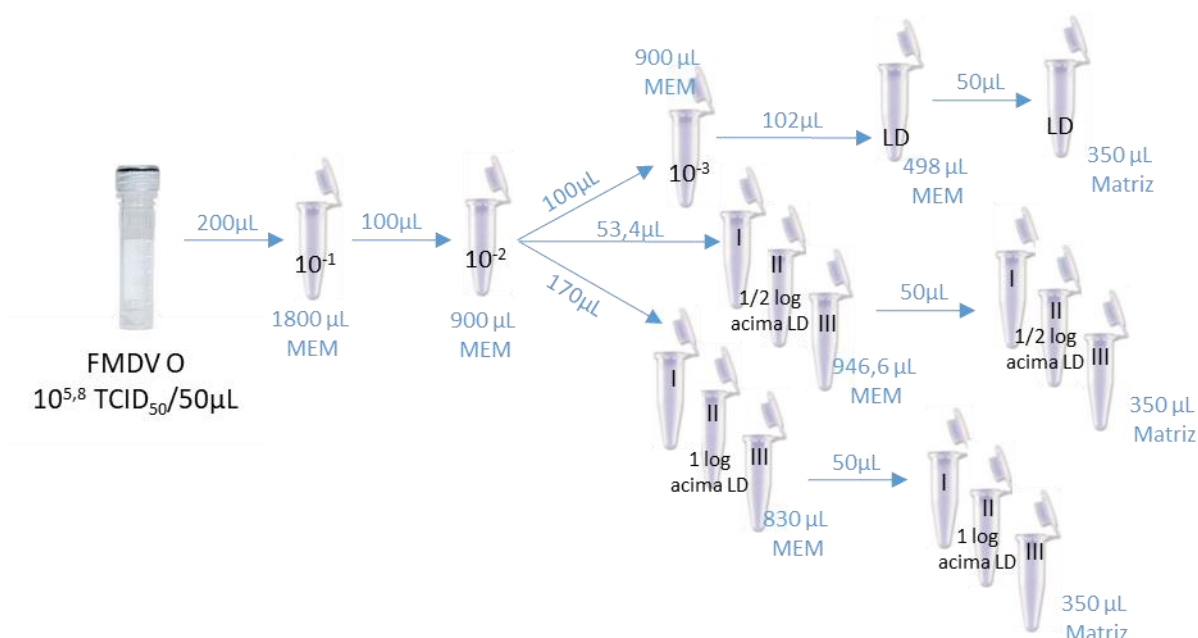
**Figura 16. Preparo das suspensões virais a serem inativadas por TRIzol® para os testes de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial.**



Fonte: Da autora.



**Figura 17. Preparo das suspensões virais a serem inativadas por *MagMAX™ CORE Lysis Solution* para os testes de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial.**



Fonte: Da autora.

Para a inativação por TRIzol®, adicionou-se 1 mL do mesmo a cada microtubo contendo matriz biológica contaminada. Homogeneizou-se e incubou-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Extraíram-se os ácidos nucléicos totais (de acordo com o item 4.3) e a RT-qPCR (item 4.4) foi realizada em triplicata.

Para a inativação por *MagMAX™ CORE Lysis Solution*, a cada microtubo contendo matriz biológica contaminada, foram adicionados 350 µL desse tampão de lise e 10 µL de proteinase *K*. Agitou-se em disruptor de células a 20 Hertz por 2 minutos, incubou-se por 8 minutos à temperatura ambiente, extraíram-se os ácidos nucléicos totais (de acordo com o item 4.3) e realizou-se RT-qPCR (item 4.4) em triplicata.

O Quadro 6 reúne as etapas de diluição da amostra viral FMDV O RS BR/80  $10^{5,8}$  TCID<sub>50</sub>/50µL (denominada amostra viral original), até a eluição dos ácidos nucléicos em 50 µL finais para aplicação em RT-qPCR.

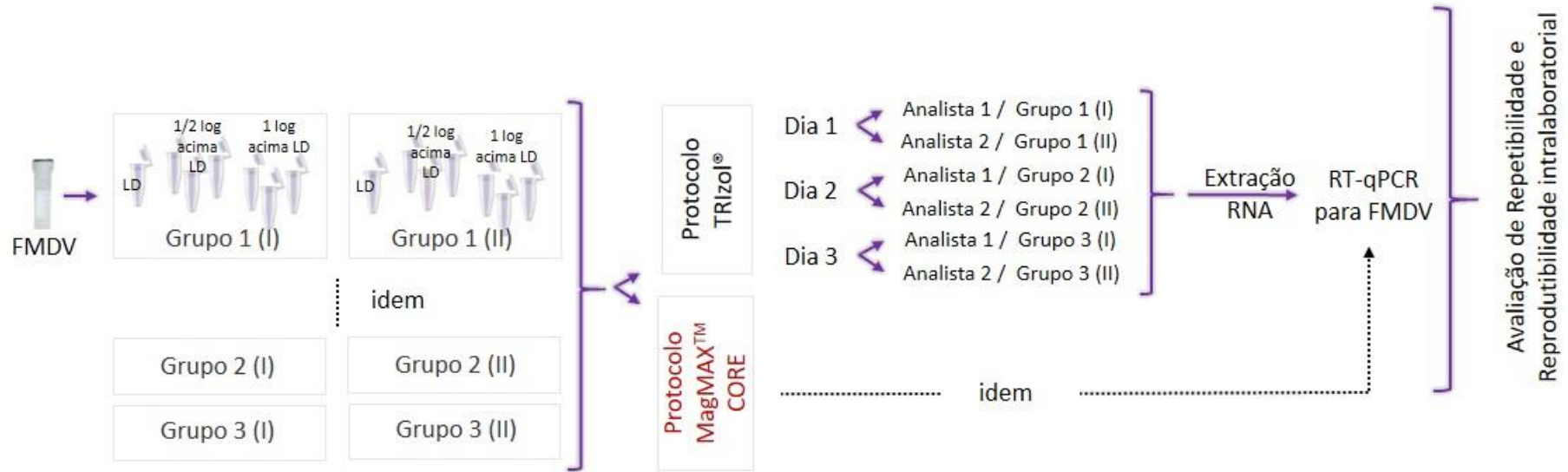
**Quadro 6. Repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial: preparo das suspensões virais e respectivos títulos teóricos (TCID50/50µL)**

Solução de partida	TRizol® (T)					MagMAX™ CORE (M)					
	Fator de diluição	Suspensão viral obtida			Concentração TCID50/50 µL = carga viral p/ contaminação da matriz; que seguiu para a inativação viral em 1mL de TRizol; e extração	Fator de diluição	Suspensão viral obtida			Concentração TCID50/ µL na matriz	Concentração TCID50/50 µL em 200µL pipetados que seguiram para inativação viral e extração
		Nome	Carga viral TCID50	Concentração TCID50/µL			Nome	Carga viral TCID50	Concentração TCID50/µL		
Amostra viral original (10 <sup>5,8</sup> TCID50/50 µL)	20	W.T	10 <sup>6,4</sup>	10 <sup>2,8</sup>	-	10	W.M	10 <sup>6,4</sup>	10 <sup>3,1</sup>	-	-
W.T / W.M	10	Y.T	10 <sup>4,8</sup>	10 <sup>1,8</sup>	-	10	Y.M	10 <sup>5,1</sup>	10 <sup>2,1</sup>	-	-
Y.T / Y.M	5,9	1 log acima LD	10 <sup>4,0</sup>	10 <sup>1,0</sup>	10 <sup>2,73</sup>	5,9	1 log acima LD	10 <sup>4,3</sup>	10 <sup>1,3</sup>	10 <sup>0,4</sup>	10 <sup>2,73</sup>
	18,8	1/2 log acima LD	10 <sup>3,5</sup>	10 <sup>0,5</sup>	10 <sup>2,23</sup>	18,7	1/2 log acima LD	10 <sup>3,8</sup>	10 <sup>0,8</sup>	10 <sup>-0,1</sup>	10 <sup>2,23</sup>
	10	X.T	10 <sup>3,8</sup>	10 <sup>0,8</sup>	-	10	X.M	10 <sup>4,1</sup>	10 <sup>1,1</sup>	-	-
X.T / X.M	5,9	LD	10 <sup>2,8</sup>	10 <sup>0,03</sup>	10 <sup>1,73</sup>	5,9	LD	10 <sup>3,1</sup>	10 <sup>0,3</sup>	10 <sup>-0,6</sup>	10 <sup>1,73</sup>

Fonte: Da autora.

Denominou-se Grupo 1 à unicata na concentração do limite de detecção (LD), triplicata de concentração  $\frac{1}{2}$  log acima do LD e triplicata de concentração 1 log acima do LD. Duas réplicas deste procedimento foram realizadas, de forma a se obter, no total, três grupos: Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3, cada qual contendo, portanto, uma suspensão viral no LD; três suspensões virais  $\frac{1}{2}$  log acima do LD; e três suspensões virais 1 log acima do LD. Para cada método de inativação viral, foram preparados dois conjuntos de Grupos 1, 2, e 3: um conjunto para ser avaliado pelo analista 1 e outro conjunto para ser avaliado pelo analista 2. A figura 18 esquematiza este fluxo de análise.

Figura 18. Esquema para avaliação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial

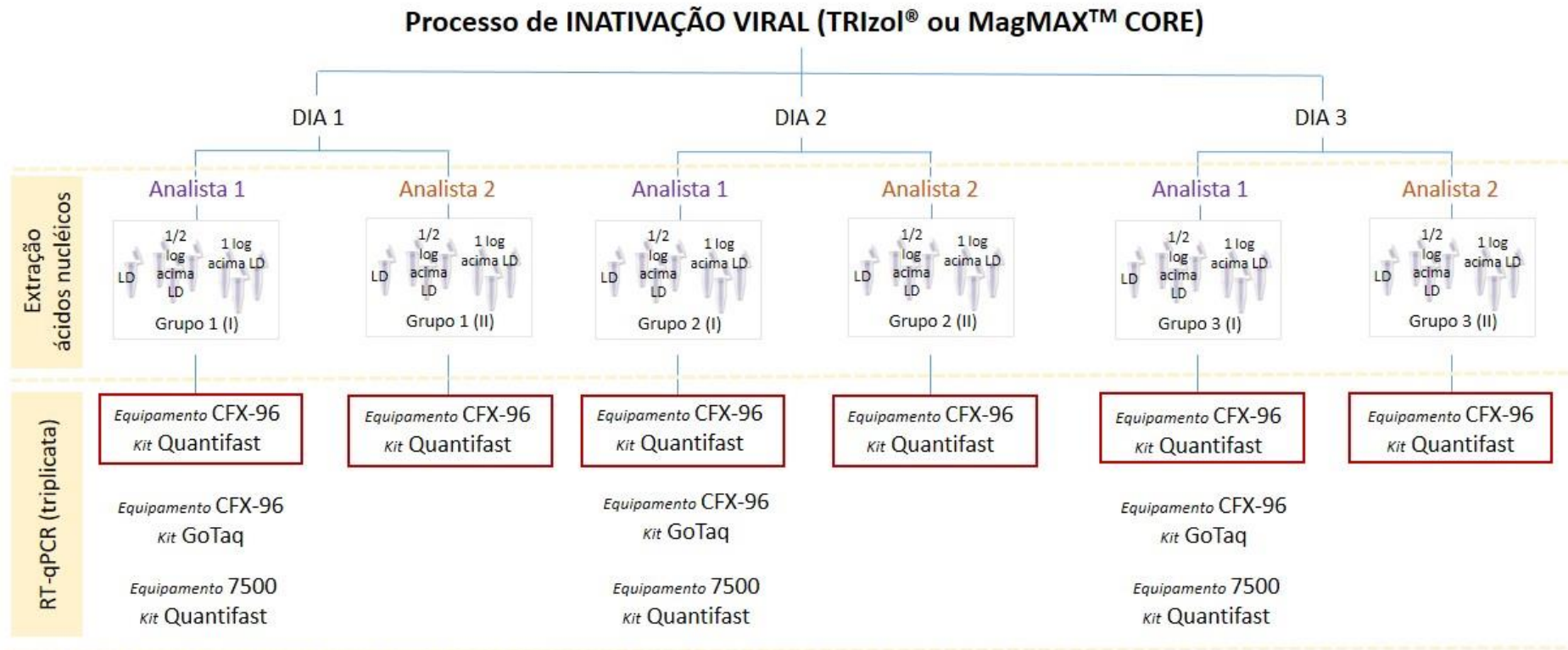


Fonte: Da autora.

Foram traçados três diferentes planos de amostragem considerando a variação do dia, do analista, do kit de RT-qPCR e do termociclador da seguinte forma:

(i) tratamento por TRIZOL® e por *MagMax™ CORE*, avaliados em mesmo equipamento termociclador [*CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, EUA)], mesmo kit de RT-qPCR [*Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha)], por dois analistas em três dias (Grupo 1 no 1º dia, Grupo 2 no 2º dia e Grupo 3 no 3º dia) como representado pela Figura 19;

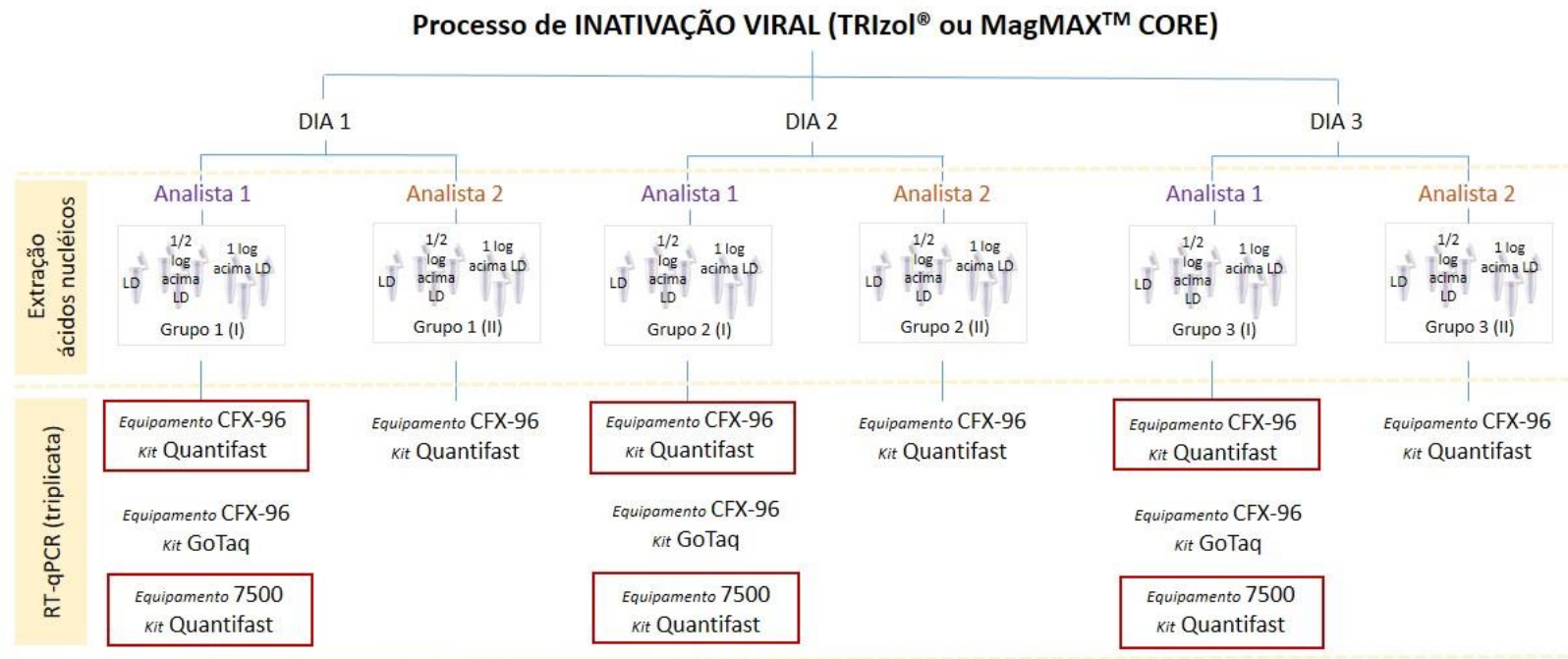
**Figura 19. Plano de amostragem I para determinação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial**



Fonte: Da autora. Destaque em vermelho para os experimentos que geraram dados de *Ct* de três dias de análise, por dois analistas empregando mesmo equipamento termociclador e mesmo kit de RT-qPCR.

(ii) tratamento por TRIzol® e por *MagMax™ CORE*, avaliados em diferentes equipamentos termocicladores [*CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, EUA) e *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems™, EUA)] e mesmo kit de RT-qPCR [*Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha)], por um analista em três dias (Grupo 1 no 1º dia, Grupo 2 no 2º dia e Grupo 3 no 3º dia) como representado pela Figura 20;

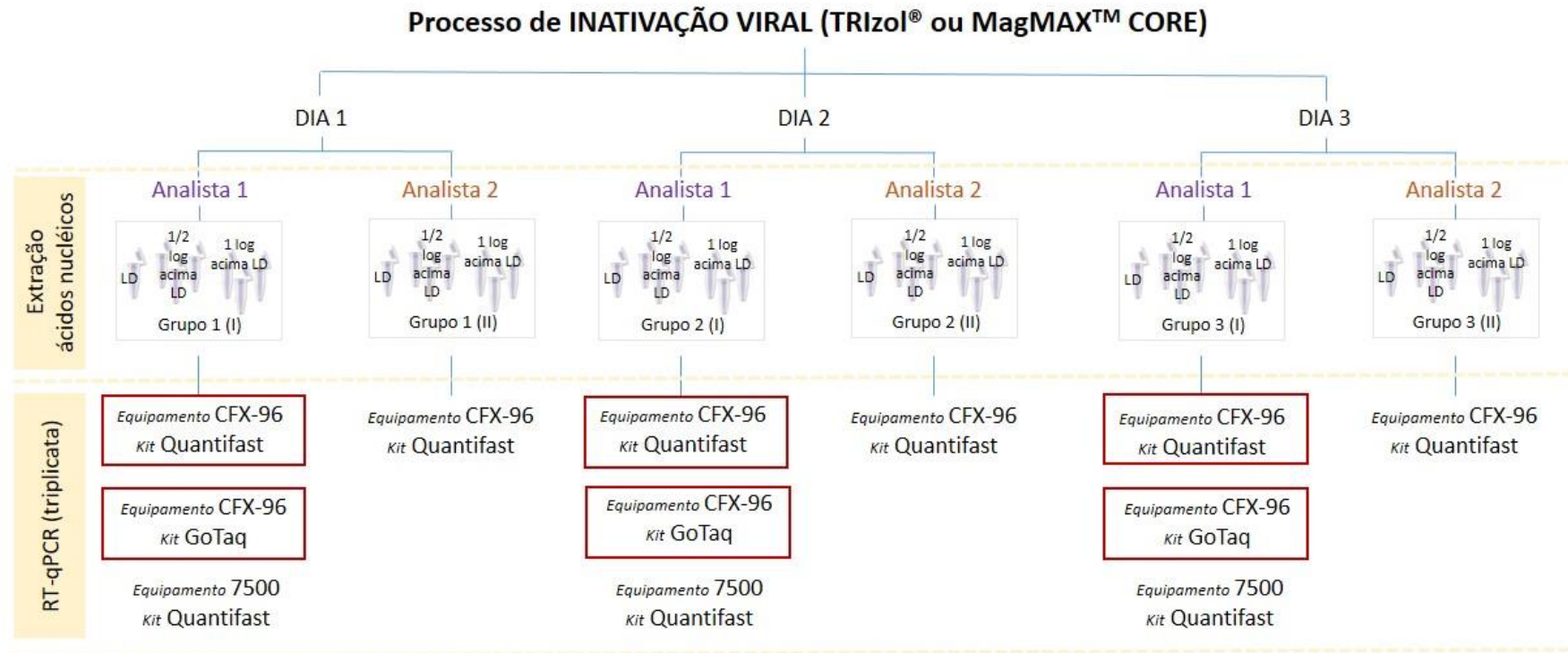
**Figura 20. Plano de amostragem II para determinação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial.**



Fonte: Da autora. Destaque em vermelho para os experimentos que geraram dados de *Ct* de três dias de análise, por um único analista empregando mesmo kit de RT-qPCR e diferindo o equipamento termociclador.

(iii) tratamento por TRIzol® e por *MagMax™ CORE*, avaliados em mesmo equipamento termociclador [*CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, EUA)] e diferentes Kits de RT-qPCR [*Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha) e *GoTaq® Probe 1- Step RT-qPCR System* (Promega, EUA)], por um analista em três dias (Grupo 1 no 1º dia, Grupo 2 no 2º dia e Grupo 3 no 3º dia) como representado pela Figura 21.

Figura 21. Plano de amostragem III para determinação de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial



Fonte: Da autora. Destaque em vermelho para os experimentos que geraram dados de *Ct* de três dias de análise, por um único analista empregando mesmo equipamento termociclador e diferindo o kit de RT-qPCR.



À determinada combinação das condições de repetibilidade e reprodutibilidade na qual foram realizadas as medidas sucessivas, convencionou-se denominar “parcela experimental” (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2015). Assim, as parcelas experimentais avaliadas consistiram em cada uma das concentrações de cada Grupo (1, 2 ou 3), para um mesmo analista e mesmo dia.

As Tabelas 7 e 8 contém as informações para o preparo do mix de RT-qPCR e ciclagem da reação referentes ao uso do *GoTaq® Probe 1- Step RT-qPCR System* (Promega, EUA).

**Tabela 7: Insumos da RT-qPCR para FMDV – kit GoTaq®**

Insumo	Volume para 1 reação (µL)
Água livre de nucleases	7,56
1X GoTaq® Probe qPCR Master Mix with dUTP	11
Iniciadores F e R / Sonda - FAM (20 µmol/µL)	1
GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR	0,44
Total	20

**Tabela 8: Ciclagem da RT-qPCR para FMDV – kit GoTaq®**

Fase	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos	Deteção
1	45°C	15 min	1	----
	95°C	2 min		----
2	95°C	15 s	45	----
	60°C	1 min		ON-FAM

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Inativação viral

As diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  da Solução de Trabalho para os reagentes de inativação puros apresentaram efeito citotóxico. Desta forma, para as Soluções de Trabalho contaminadas com suspensão viral nestas diluições, não foi possível distinguir o efeito citotóxico do citopático.

Já a partir da diluição  $10^{-3}$ , em que não houve efeito citotóxico, a avaliação da inativação viral foi factível. O Quadro 7 mostra os resultados referentes a leitura das placas de cultivo celular para cada uma das variáveis testadas (ver item 4.5.1.2), a partir da diluição  $10^{-3}$ . As suspensões virais que não apresentaram ECP na 1ª passagem de células foram submetidas até mais duas passagens cegas. Passagens sucessivas permitem a multiplicação viral proveniente de títulos virais muito baixos, que poderiam ser indetectáveis por outros ensaios, porém com potencial infeccioso (SMITHER et al., 2015).

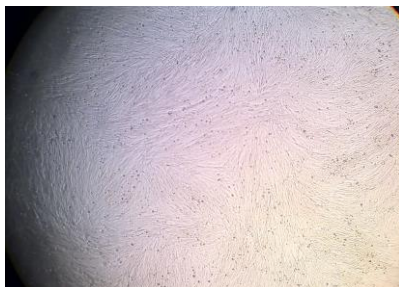
**Quadro 7. Presença (+) / Ausência (-) de efeito citopático em células BHK21**

Diluição da Solução de Trabalho	Réplica	Avaliação de citotoxicidade		Avaliação de inativação viral											
		(A) Reagentes de inativação	(E) Matriz biológica	(B) FMDV - contaminação experimental em MEM, não inativada			(C) FMDV – contaminação experimental em MEM seguida de inativação por <i>MagMAX™ CORE</i>			(D) FMDV – contaminação experimental em matriz biológica seguida de inativação por <i>MagMAX™ CORE</i>			(F) FMDV – contaminação experimental em matriz biológica, não inativada		
				1ª P	2ª P	3ª P	1ª P	2ª P	3ª P	1ª P	2ª P	3ª P	1ª P	2ª P	3ª P
10 <sup>-3</sup>	I	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
	II	-	-	+	nr	nr	+	nr	nr	-	-	-	+	nr	nr
	III	-	-	+	nr	nr	+	nr	nr	-	-	-	+	nr	nr
10 <sup>-4</sup>	I	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
	II	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
	III	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
10 <sup>-5</sup>	I	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
	II	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
	III	-	-	+	nr	nr	-	-	-	-	-	-	+	nr	nr
10 <sup>-6</sup>	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Da autora. “+” indica presença de efeito citopático; “-” indica ausência de efeito citopático; “nr” indica não realizado; P indica passagem em célula.

As Figuras 22 a 26 mostram secções de imagens obtidas por câmara fotográfica Nokia Lumia 830 (MICROSOFT MOBILE, Finlândia), dos poços de cultivo celular durante avaliação do efeito citotóxico e/ou ECP.

**Figura 22. Cultivo celular. Controle de células BHK21**



Fonte: Da autora. Monocamada celular intacta. Microscopia óptica invertida; Aumento de 40X.

**Figura 23. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho A (reagentes inativantes)**



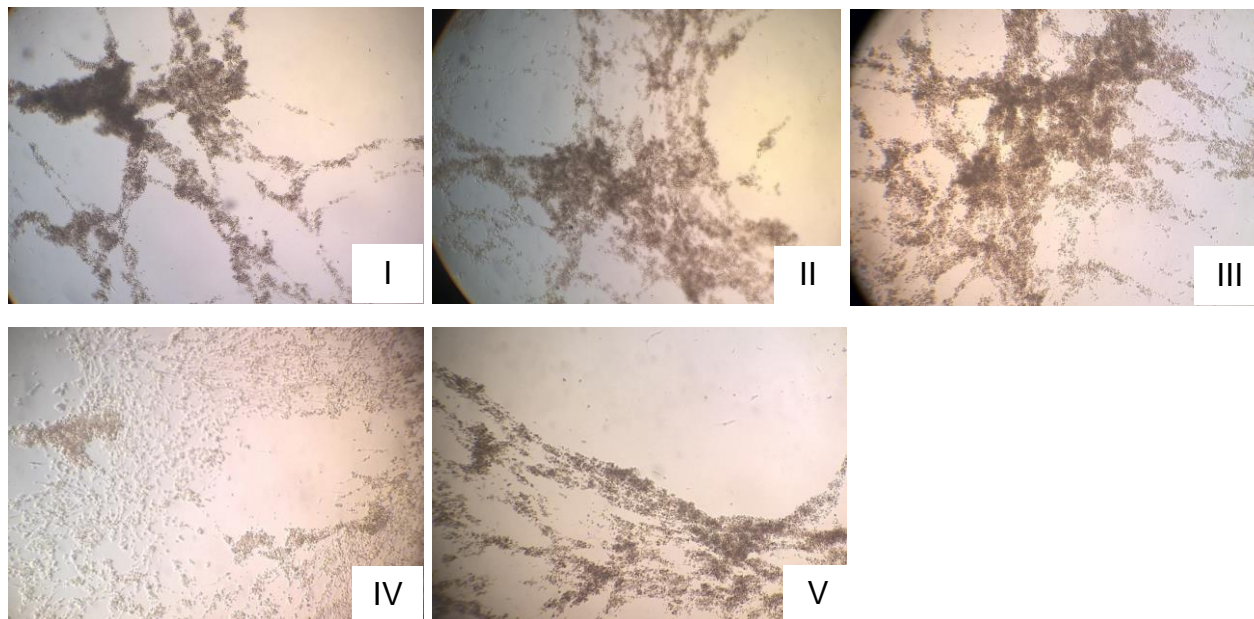
Fonte: Da autora. Destaque para o efeito tóxico dos reagentes de inativação à monocamada celular. I. Diluição  $10^{-1}$ . II. Diluição  $10^{-2}$ . III. Diluição  $10^{-3}$ . Microscopia óptica invertida; Aumento de 40X.

**Figura 24. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho E (matriz biológica LEF)**



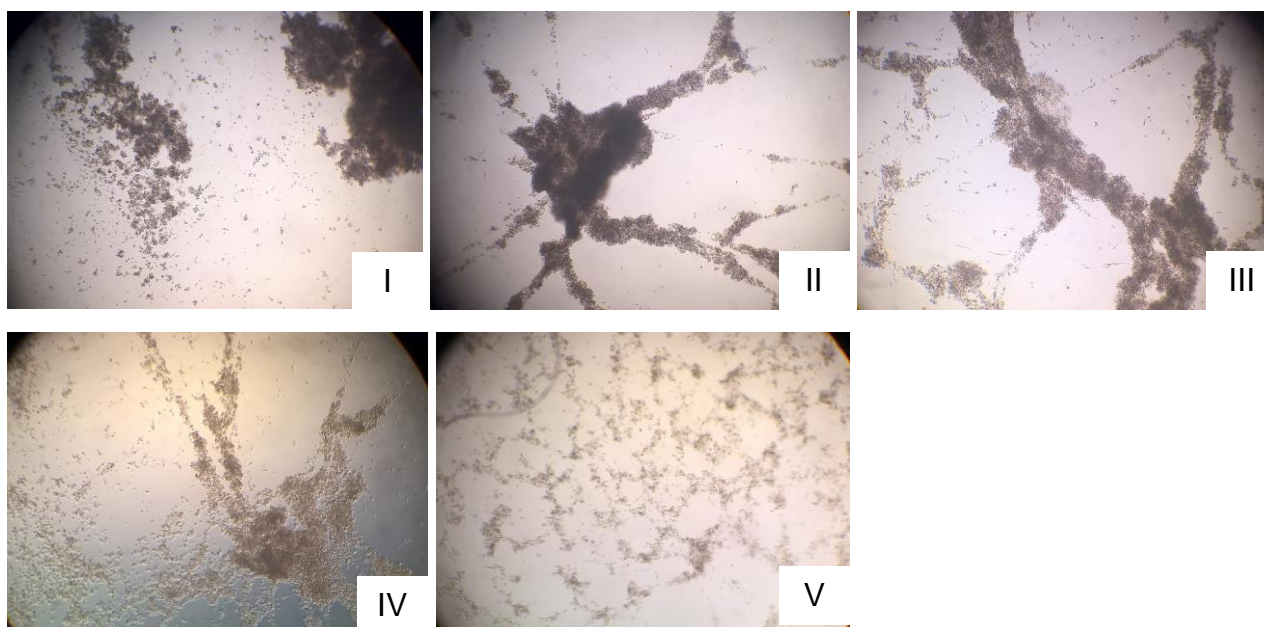
Fonte: Da autora. Diluição  $10^{-1}$ , evidenciando monocamada celular intacta. Microscopia óptica invertida; Aumento de 40X.

**Figura 25. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho B (contaminação experimental de MEM com FMDV, não inativada)**



Fonte: Da autora. Diluição  $10^{-1}$  II. Diluição  $10^{-2}$  III. Diluição  $10^{-3}$  IV. Diluição  $10^{-4}$  V. Diluição  $10^{-5}$ . Microscopia óptica invertida; Aumento de 40X.

**Figura 26. Cultivo celular. Replicata da Solução de Trabalho F (contaminação experimental de matriz biológica com FMDV, não inativada)**



Fonte: Da autora. I. Diluição  $10^{-1}$  II. Diluição  $10^{-2}$  III. Diluição  $10^{-3}$  IV. Diluição  $10^{-4}$  V. Diluição  $10^{-5}$ . Microscopia óptica invertida; Aumento de 40X.

Conforme descrito por Shahiduzzaman e colaboradores (2016), os efeitos citopáticos de FMDV observados em células BHK21 compreendem arredondamento e achatamento das células, formação de células gigantes multinucleadas, rompimento das pontes intracelulares e finalmente, morte celular. Desprendimento da monocamada celular também foi relatado (MAHMUD et al., 2018).

O efeito de toxicidade do tampão de lise na célula se confundiu com o efeito citopático do FMDV. A comum indistinguibilidade visual entre o efeito citotóxico e o efeito citopático mediado por vírus, em experimentos que utilizam cultura de células, consiste numa limitação do emprego de reagentes de inativação contendo detergente e sal caotrópico (VINNER; FOMSGAARD, 2007).

A possibilidade de ocorrência do efeito citotóxico da própria matriz biológica também foi considerada, mas ficou demonstrada a não citotoxicidade (Solução de Trabalho E). O LEF coletado apresenta algumas sujidades, provenientes por exemplo da atividade de ruminância do bovino. A Figura 27 corresponde a uma amostra de LEF ideal, coletada no LFDA-MG por profissional experiente. Ainda assim, é possível observar impurezas advindas do processo de coleta com a *probang*. Diferenças causadas pelo grau de habilidade técnica e dificuldades pontuais nas numerosas propriedades de toda a extensão territorial nacional, podem implicar em amostras mais sujas, inclusive com presença de sangue. Componentes copurificados durante o processo de extração de ácidos nucléicos de amostras biológicas comumente relatados como agentes inibidores de PCR, englobam a heparina, imunoglobulina G (GUESCINI et al., 2008), a hemoglobina (SIDSTEDT et al., 2018), dentre outros.

**Figura 27: Pool de líquido esofágico faríngeo bovino coletado com *probang***



Fonte: Da autora. Destaque para as sujidades depositadas ao fundo do frasco armazenador.

Os reagentes do protocolo de inativação viral apresentaram efeito tóxico às células BHK21 nas diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , para 100% das replicatas (A). Assim, para estas diluições das demais Soluções de Trabalho, não se pode aferir se o efeito observado foi devido à atividade viral ou à toxicidade dos reagentes à célula. As suspensões virais que não passaram por processo de inativação viral por *MagMAX™ CORE Lysis Solution* (B e F), desencadearam ECP até a diluição  $10^{-5}$ . Por conseguinte, a diluição  $10^{-3}$  das Soluções de Trabalho foi aquela necessária para superar a toxicidade celular do tampão de lise e proteinase K. Pode-se inferir que o efeito observado nas células a partir dessa diluição, correspondeu apenas ao efeito citopático causado pelas partículas virais infecciosas.

A inativação viral foi evidenciada ao se comparar o efeito citopático induzido pelo vírus em Soluções de Trabalho não submetidas ao tratamento, com aquelas nas quais foi utilizado o protocolo de inativação.

Na diluição  $10^{-3}$ , as três replicatas do vírus sem tratamento (B) e da matriz biológica LEF contaminada sem tratamento (F) induziram efeito citopático, funcionando como um controle comparativo das condições de teste de inativação (C e D). Além disso, foi realizada confirmação da inativação viral através da repetição do experimento (D), em virtude do objetivo deste trabalho consistir em avaliar a inativação de FMDV no LEF, material de coleta a campo. É interessante destacar que nesta diluição observou-se efeito citopático na ausência da matriz biológica (C) em 2/3 das replicatas, enquanto que na presença da matriz biológica, observou-se 100% de inativação viral. Este resultado sugere uma possível interação do MEM com o tampão de lise que dificulte o efeito inativante, contudo, uma resposta conclusiva requer testes investigativos, como mais repetições nas mesmas condições já testadas, e isolar a variável MEM através da comparação da inativação de amostras positivas antes e depois da adição do meio.

Não foi observado efeito citopático a partir da diluição  $10^{-4}$  sob tratamento de inativação, tanto para o vírus sem efeito de matriz biológica (C), quanto para amostra biológica contaminada (D), em 100% das replicatas. De maneira contrária, as amostras não tratadas para a inativação (B) indicaram presença viral em 100% das replicatas na diluição  $10^{-5}$ .

A repetição dos resultados da técnica de isolamento viral foi alcançada para as suspensões virais em matriz biológica (D) submetidas à inativação viral por *MagMAX™ CORE Lysis Solution*, confirmando a eficácia da inativação. Este teste de repetição foi realizado para as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Concomitantemente aplicou-se nas placas de cultivo celular, duplicata de controle positivo da atividade viral para cada diluição, além dos controles de células (controles negativos), que consistiram de células não inoculadas com o vírus. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. **Repetição do teste de isolamento viral em matriz biológica LEF inativada por *MagMAX™ CORE Lysis Solution***

10 <sup>-3</sup> inativada			10 <sup>-4</sup> inativada		
Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3
I -	I -	I -	I -	I -	I -
II -	II -	II -	II -	II -	II -
III -	III -	III -	III -	III -	III -
IV -	IV -	IV -	IV -	IV -	IV -
V -	V -	V -	V -	V -	V -
VI -	VI -	VI -	VI -	VI -	VI -
VII -	VII -	VII -	VII -	VII -	VII -
10 <sup>-3</sup> controle positivo			10 <sup>-4</sup> controle positivo		
+	+	nr	+	+	nr
10 <sup>-3</sup> controle negativo			10 <sup>-4</sup> controle negativo		
-	nr	nr	-	nr	nr

“+” indica presença de ECP; “-” indica ausência de ECP; “nr” indica não realizado

O ponto de corte (*cut-off*) de uma reação RT-qPCR é baseado no máximo número de ciclos em que há curva de amplificação característica. O protocolo do LFDA-MG para amostras vesiculares de rotina (sob catalogação interna MET/LDDV/PL/086), estabelece que amostras com *Ct* acima de 40 são consideradas negativas; amostras com *Ct* abaixo de 37 são consideradas positivas; e amostras com *Ct* entre 37 e 40, são consideradas suspeitas. Este documento prevê que, para amostras suspeitas, devem ser realizadas triplicatas da mesma reação, e persistindo o resultado inconclusivo ou no caso da detecção do RNA do FMDV, deve-se proceder a pelo menos mais uma PCR com diferentes alvos do genoma do vírus, para confirmação do resultado: região que codifica para a 3D polimerase de 88 pb (MONIWA et al., 2007); região não traduzida (*untranslated*) 5'UTR (REID et al., 2001); porção IRES da região não



traduzida (*untranslated*) de 145 pb (WERNIKE; HOFFMANN; BEER, 2013)(WERNIKE; HOFFMANN; BEER, 2013); ou ainda as regiões 5´UTR de 328 pb (REID et al., 2001) e região codificadora da proteína VP1 para os sorotipos O, A e C, de 1301, 863 a 866, e 813 a 816 pb, respectivamente (MALIRAT; BERGMANN, 2003) para confirmação de resultados, aliada ao sequenciamento genético. Além disso, ao se tratar de amostra de LEF avaliada pelo diagnóstico molecular como positiva para Febre Aftosa no LFDA-MG, deve-se proceder também ao isolamento viral como teste confirmatório.

Está descrito na literatura que valores de *Ct* maiores que 40 são suspeitos devido à baixa eficiência implícita e geralmente não devem ser relatados; no entanto, o uso de pontos de corte arbitrários de *Ct* não é ideal (BUSTIN et al., 2009), pois eles podem ser muito baixos (eliminando resultados válidos) ou muito altos (aumentando resultados falso-positivos) como conclui estudo de Burns e Valdivia (2008). Neste estudo, adotou-se trabalhar na zona de concentração cuja resposta em termos de *Ct* da reação de PCR é considerada inconclusiva, tendo em vista que a metodologia de diagnóstico molecular empregada neste trabalho já é validada e verificada no LFDA-MG, e que respostas provenientes da análise dessa zona especificamente, poderiam trazer novas inferências e conclusões ao diagnóstico molecular de Febre Aftosa. Dessa forma, foram consideradas negativas apenas as amostras para as quais nenhuma curva de amplificação foi detectada, tendo em vista que as amostras eram sabidamente positivas.

Tanto o processo de inativação viral por MagMAX™ CORE *Lysis Solution*, quanto pelo Trizol®, pelos quais as amostras submetidas à RT-qPCR passaram, não inviabilizam o genoma viral para detecção por testes moleculares. De fato, isso foi demonstrado pela amplificação do alvo da RT-qPCR para as diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  (correspondentes a  $10^{1,91}$  e  $10^{0,91}$  TCID<sub>50</sub>/50µL, respectivamente, após extração do RNA, conforme Quadro 4). Estes resultados seguem na Tabela 10, que compara os dados (*Ct*) de suspensões virais tratadas por TRIZOL®, com os dados (*Ct*) de alíquotas da placa de isolamento viral que foram anteriormente tratadas por MagMAX™ CORE, e que após serem alíquotadas, tiveram que ser tratadas por TRIZOL® visto a obrigatoriedade deste processo nas instalações do LFDA-MG para viabilizar a manipulação das amostras em níveis de biossegurança mais baixos (Itens 4.5.2 e 4.5.3).

Tabela 10. **Cycle Threshold (Ct)** da RT-qPCR para as suspensões virais tratadas *versus* não tratadas por **MagMAX™ CORE Lysis Solution** na etapa de verificação da inativação viral

Diluição 10 <sup>-3</sup>		Diluição 10 <sup>-4</sup>	
Alíquota não tratada por <b>MagMAX™ CORE</b> [Tratada por TRizol® - Item 4.5.3]	Alíquota da placa de isolamento viral [tratada por <b>MagMAX™ CORE</b> e TRizol® - Item 4.5.2]	Alíquota não tratada por <b>MagMAX™ CORE</b> [Tratada por TRizol® - Item 4.5.3]	Alíquota da placa de isolamento viral [tratada por <b>MagMAX™ CORE</b> e TRizol® - Item 4.5.2]
32,49	35,06	39,27	N/A
32,77	35,00	37,12	N/A
31,69	39,40	35,32	39,40
32,41	34,67	36,52	N/A
32,81	34,76	37,74	N/A
32,25	35,02	36,51	N/A
33,01	36,98	36,97	38,56
32,95	34,89	36,09	39,13
32,49	34,66	34,68	N/A
32,49	35,37	33,66	N/A
32,56	35,87	33,79	N/A
31,93	38,28	34,91	N/A
31,21	37,30	34,46	38,09
32,12	36,73	34,62	N/A
33,12	32,95	34,29	N/A
32,56	32,49	34,42	N/A
32,44	32,49	34,60	39,21
31,94	32,56	34,76	N/A
33,53	31,93	36,23	36,15
33,10	31,21	34,24	39,24
33,09	32,12	34,97	39,17
<b>MÉDIA</b> 32,49	34,89	35,48	-
<b>DESVIO</b> 0,55	2,20	1,45	-
<b>CV (%)</b> 0,30	4,85	2,10	-

“N/A” indica amplificação ausente

O conteúdo da placa de isolamento viral foi detectado na RT-qPCR para todas as amostras na diluição 10<sup>-3</sup>, o que não ocorreu para a diluição 10<sup>-4</sup>, em que 13 das 21 repetições não apresentaram sinal de fluorescência detectado pelo equipamento. A detecção de ácido nucléico do vírus nas amostras 10<sup>-3</sup> submetidas ao protocolo **MagMAX™ CORE**, confirmou a inativação viral já demonstrada indiretamente pela observação de ECP nas diluições correspondentes não inativadas (diluições 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup> da Solução de Trabalho B). Portanto, em conjunto, a técnica de isolamento, que detecta partículas virais

viáveis, e a reação de RT-qPCR que evidencia a presença de genoma viral independente de ser ele proveniente de partícula viral viável ou não, confirmaram a eficiência do protocolo em teste para a inativação do FMDV. Para a diluição  $10^{-3}$  foi possível calcular valores de média, desvio padrão e coeficiente de variação. Eles foram maiores para o procedimento com maior número de etapas de manipulação, ou seja, a suspensão viral inativada por MagMAX™ CORE, inoculada em BHK21, alíquotada para tratamento por TRIzol® e finalmente, submetida à extração de RNA e à RT-qPCR. A média foi de 34,89; desvio 2,20; CV 4,85% contra média de 32,49; desvio 0,55 e CV 0,30% para o grupo de alíquotas preparadas sem passar por processo de inativação MagMAX™ CORE e isolamento viral.

As cargas virais das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  da Solução de Trabalho foram representativas de amostras de campo em situação de surto de Febre Aftosa, conforme dados de ensaio de infectividade do FMDV conduzido por Gomes e colaboradores (1997). Tal estudo, que constatou padrão de transmissão do FMDV similar entre bovinos e bubalinos, avaliou a transmissão do vírus a partir de animais sem histórico de vacinação ou evidência de anticorpos contra o FMDV. Dois bovinos e dois bubalinos foram desafiados com a amostra de origem bovina FMDV O1 Campos, através de instilação nasal com 2,5 mL de suspensão viral  $10^4$  ID<sub>50</sub> em cada narina. Foram então, alocados de forma a compor duas unidades de isolamento, junto a animais não infectados: uma unidade contendo os dois bovinos infectados, mais um bovino e três búfalos; e outra contendo os dois búfalos infectados, mais um búfalo e três bovinos. Além dos sinais clínicos, da viremia e da persistência viral, a replicação do vírus foi monitorada. Para tanto, foi coletado material orofaríngeo a zero, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após inoculação ou contato com animal infectado. Este material foi tratado com triclorotrifluoretano a 70% e imediatamente inoculado em monocada de IBRS2, para exame de efeito citopático. Quando positivo, o teste confirmatório de fixação de complemento foi aplicado. Os títulos mensurados em amostras bovinas, nos 5 dias após inoculação ou contato com animal inoculado, variaram entre  $10^{1,32}$  e  $10^{6,15}$  TCID<sub>50</sub>/mL, conforme Tabela 11. Esta faixa de concentração abrange os  $10^{3,35}$  e  $10^{2,35}$  TCID<sub>50</sub>/mL das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  da Solução de Trabalho (conforme Quadro 4), indicando a representatividade das

concentrações trabalhadas relativamente a uma situação real de infecção aguda da FMD.

**Tabela 11. Título viral (log ID<sub>50</sub>/mL) de bovinos infectados por FMDV (GOMES et al., 1997) comparativamente ao título viral das Soluções de Trabalho adotadas na etapa de inativação viral do presente estudo**

Animal / forma de contágio	GOMES et al., 1997					Solução de Trabalho	
	Dias após inoculação ou contato					Nome	Título
	1	2	3	4	5		
Bovino 1 / Instilação	2,57	2,88	5,30	4,97	5,26	-1	5,35
Bovino 2 / Instilação	2,79	3,91	4,81	4,31	3,85	-2	4,35
Bovino 3 / Contato com gado infectado	1,75	2,02	1,32	6,15	4,64	-3	3,35
Bovino 4 / Contato com búfalo infectado	-	1,45	-	4,28	4,66	-4	2,35
Bovino 5 / Contato com búfalo infectado	1,77	1,82	4,97	4,85	4,10	-5	1,35
Bovino 6 / Contato com búfalo infectado	1,32	2,01	1,50	5,93	-	-6	0,35

Os resultados do teste de inativação viral com o MagMAX™ CORE *Lysis Solution* foram satisfatórios. Ainda assim, é preciso ter em mente que mensurar a inativação viral esbarra nas limitações dos aspectos técnicos de cada ensaio (NGO et al., 2017). As investigações deste trabalho limitaram-se (I) ao uso da matriz biológica líquido esofágico faríngeo bovino nas condições em que ela chega da coleta de campo, (II) à contaminação experimental, (III) a títulos virais que não excederam 10<sup>4,05</sup> TCID<sub>50</sub>/50 µL, além de (IV) comprovação empírica somente em diluições que superaram o efeito citotóxico causado pelos reagentes de inativação testados. Contudo, resultados de estudos conduzidos por Wood e colaboradores (2020), publicados no período de execução deste projeto, confirmam o efeito inativante de MagMAX™ CORE *Lysis Solution* ao FMDV, endossando sua eficácia. Os dados aqui obtidos podem direcionar novos estudos objetivando a investigação da inativação do FMDV em matrizes biológicas mais complexas e mais recorrentes na rotina do LFDA-MG, como epitélios bovino e suíno.

## 5.2 Verificação de desempenho do método diagnóstico molecular de FMD empregando o uso do kit QuantiFast e termociclador CFX96, tendo por variável o processo de inativação viral (TRizol® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution)

A partir deste momento do desenvolvimento das análises, a autorização para a retirada das amostras tratadas apenas com o protocolo MagMAX™ CORE do nível de Biossegurança 4 já havia sido alcançada, e portanto, a comparação entre as respostas que os diferentes tratamentos de inativação acarretaram para o diagnóstico final por RT-qPCR, foi realizada de maneira que o tratamento por MagMAX™ CORE *Lysis Solution* não sofreu interferência do TRizol® (como havia acontecido para a RT-qPCR na etapa de avaliação da inativação viral, anteriormente descrita).

Primeiramente foram avaliados os parâmetros LD, eficiência, incerteza, e variâncias devidas à repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial de cada um dos processos metodológicos separadamente, conforme preconizado pelo Manual de Verificação de Desempenho de Métodos: aquele que usou o TRizol® como inativante, e aquele que usou o MagMAX™ CORE *Lysis Solution* como inativante. Nesta etapa, as variáveis consistiram em *dia* (três dias de extração e RT-qPCR), *analista* (dois analistas) e *parcelas experimentais* (três diferentes concentrações, sendo a primeira delas igual ao LD em unicata, a segunda igual a ½ log acima do LD em triplicata e a terceira concentração igual a 1 log acima do LD em triplicata, totalizando sete amostras). O kit RT-qPCR de escolha foi aquele em uso principal na rotina do LFDA-MG quando do desenvolvimento do projeto: o *Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha). Devido à natureza do processo de aquisição de insumos ao qual as instituições federais estão vinculadas, as marcas dos kits podem variar a cada processo de compras iniciado, a depender do preço ofertado em pregão eletrônico, onde ganha a marca que atender às especificações requeridas e ofertar o menor preço. O termociclador de escolha utilizado nesta etapa foi o *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, EUA) pelo fato de ser o modelo mais comumente utilizado no LFDA-MG em virtude de suas facilidades e opções operacionais (interface amigável, opções de reportar dados facilitada, uso de placa de 96 poços, dentre outras).

Em todas as etapas da verificação de desempenho do método, a linha de limiar (*threshold*) dos gráficos de amplificação foi ajustada manualmente para o valor de 196,38 RFU (unidade relativa de fluorescência) para todas as reações. Para fins estatísticos, as amostras cuja amplificação não ocorreu ou não foi detectada pelo equipamento (não houve valor de *Ct* determinado), tiveram seu valor de *Ct* convencionado em 40.

### **5.2.1 Determinação do limite de detecção**

O limite de detecção do método diagnóstico alcançado foi o mesmo para as suspensões virais inativadas por TRIzol® e pelo tampão de lise MagMAX™ CORE, e correspondeu ao ponto III.b, de  $10^{1,7}$  TCID<sub>50</sub>/50 µL. Para amostras inativadas por TRIzol®, a média de *Ct* para a triplicata deste ponto em meio MEM foi de 35,86 com desvio padrão de 0,74 e em matriz biológica LEF de 37,35 com desvio padrão de 1,03. Para amostras inativadas por MagMAX™ CORE, a média de *Ct* para a triplicata deste ponto em meio MEM foi igual a 36,16 com desvio padrão de 0,57 e em matriz biológica LEF foi de 36,02 com desvio padrão de 0,85.

Os resultados de *Ct* relativos às reações RT-qPCR de todos os pontos de concentração testados estão relacionados na Tabela 12. Observa-se que quando a contaminação viral ocorreu em meio MEM, a média das triplicatas de cada ponto da curva de concentração, ora foi menor para tratamento por TRIzol®, ora para tratamento por MagMAX™ CORE. Já quando compara-se a contaminação viral em LEF, amostras tratadas por MagMAX™ CORE obtiveram médias de *Ct* menores do que quando tratadas por TRIzol® para o mesmo ponto de concentração.

Tabela 12. **Cycle Threshold (Ct)** dos pontos de concentração para inativação por TRizol® versus inativação por MagMax™ CORE Lysis Solution

Ponto da curva de concentração (Nome / TCID <sub>50</sub> /50µL)	TRizol®		MagMax™ CORE	
	MEM contaminado experimentalmente	Matriz biológica LEF contaminada experimentalmente	MEM contaminado experimentalmente	Matriz biológica LEF contaminada experimentalmente
I / 10 <sup>4,1</sup>	28,14	29,54	26,87	27,39
	28,24	29,25	26,81	27,35
	28,29	29,03	26,92	27,46
Média	28,22	29,27	26,87	27,40
σ	0,08	0,26	0,06	0,06
II / 10 <sup>3,1</sup>	30,80	32,24	30,30	30,71
	30,97	32,36	30,19	30,51
	31,00	32,03	30,42	31,09
Média	30,92	32,21	30,30	30,77
σ	0,11	0,17	0,12	0,29
II.a / 10 <sup>2,8</sup>	32,26	32,79	31,72	31,99
	32,20	32,84	31,41	32,12
	32,31	32,68	31,83	32,10
Média	32,26	32,77	31,65	32,07
σ	0,06	0,08	0,22	0,07
III / 10 <sup>2,1</sup>	34,36	37,32	34,44	34,14
	34,58	35,18	34,60	34,14
	34,47	36,22	34,23	34,01
Média	34,47	36,24	34,42	34,10
σ	0,11	1,07	0,19	0,08
III.a / 10 <sup>1,8</sup>	34,58	36,19	35,49	35,78
	35,53	36,16	35,20	34,99
	34,87	36,99	35,11	35,95
Média	34,99	36,45	35,27	35,57
σ	0,49	0,47	0,20	0,51
III.b / 10 <sup>1,7</sup>	36,71	36,63	36,39	36,24
	35,50	36,89	36,58	35,09
	35,38	38,53	35,52	36,74
Média	35,86	37,35	36,16	36,02
σ	0,74	1,03	0,57	0,85
IV / 10 <sup>1,1</sup>	37,91	N/A	38,02	37,02
	37,90	N/A	37,45	36,48
	38,40	39,65	37,29	37,58
Média	38,07	39,65	37,59	37,03
σ	0,29	-	0,38	0,55

σ = Desvio Padrão; N/A = amplificação ausente;

A confirmação do LD, prevista no Manual de Verificação de Desempenho de Métodos, foi realizada com 21 replicatas do vírus em matriz biológica LEF, que foram preparadas, inativadas e extraídas de forma independente, e posteriormente aplicadas em unicata na RT-qPCR. O ponto IV da curva de concentração correspondente a 10<sup>1,1</sup> TCID<sub>50</sub>/50 µL mostrado na Tabela 13 foi

amplificado na triplicada para as amostras tratadas por MagMAX™ CORE, contudo, não foi confirmado quando das 21 repetições (dados não mostrados). Assim, repetiu-se o experimento da confirmação por 21 repetições para amostras tratadas por MagMAX™ CORE com o ponto III.b. A resposta (*Ct*) da etapa de confirmação do LD pode ser vista, para ambos os métodos de inativação, na Tabela 13. Para amostras inativadas por TRIzol®, 20 das 21 replicatas apresentaram amplificação tendo o *Ct* variado de 36,64 a 40,42, e para amostras inativadas por MagMAX™ CORE, 21 de 21 replicatas foram amplificadas, tendo o *Ct* variado de 33,65 a 35,38. Mais uma vez, amostras tratadas por MagMax™ CORE apresentaram menor valor de média do que amostras tratadas por TRIzol®. O valor de desvio padrão para as 21 replicatas também foi menor quando a inativação foi feita por MagMax™ CORE.

Tabela 13. **Cycle Threshold (*Ct*) da RT-qPCR para confirmação do limite de detecção de suspensões virais inativadas por TRIzol® versus suspensões virais inativadas por MagMax™ CORE Lysis Solution**

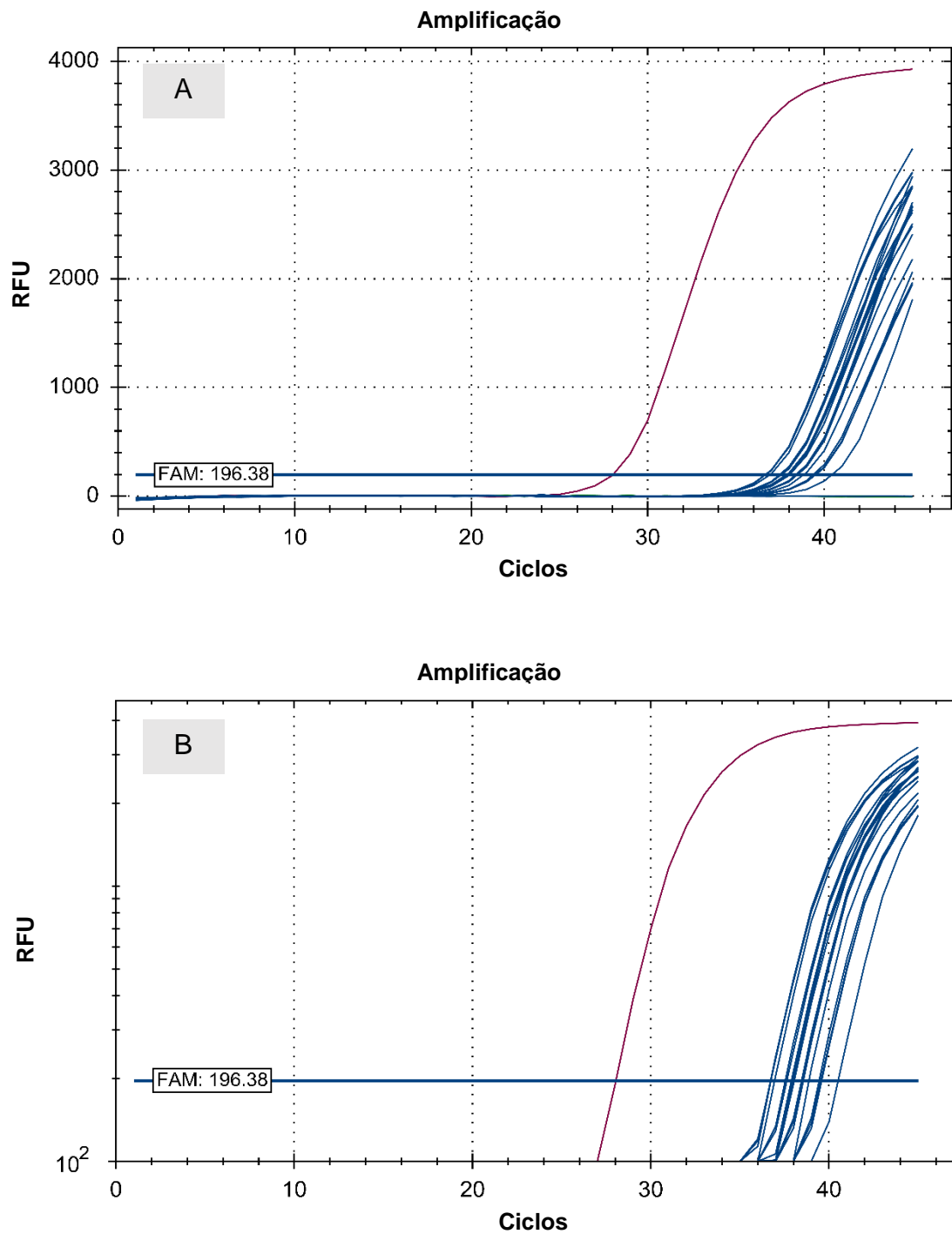
Ponto da curva de concentração	TRIzol®			MagMax™ CORE		
III.b (10 <sup>1,7</sup> TCID <sub>50</sub> /50µL)	38,37	36,66	37,95	34,51	33,81	34,99
	37,85	38,03	38,47	34,45	34,93	34,15
	37,55	39,36	38,82	34,14	34,44	35,38
	39,50	36,64	38,38	34,70	34,55	34,64
	37,89	39,45	37,89	34,11	34,65	34,48
	36,92	37,97	N/A	34,21	34,53	34,86
	36,66	37,46	40,42	34,63	33,65	35,32
<b>Média / σ</b>	38,20 / 1,08			34,53 / 0,43		

“N/A” indica amplificação ausente

As curvas de amplificação correspondentes a etapa de confirmação do limite de detecção para matriz biológica LEF estão representadas nas Figuras 28 e 29, respectivamente para inativação por TRIzol® e por MagMax™ CORE Lysis Solution.

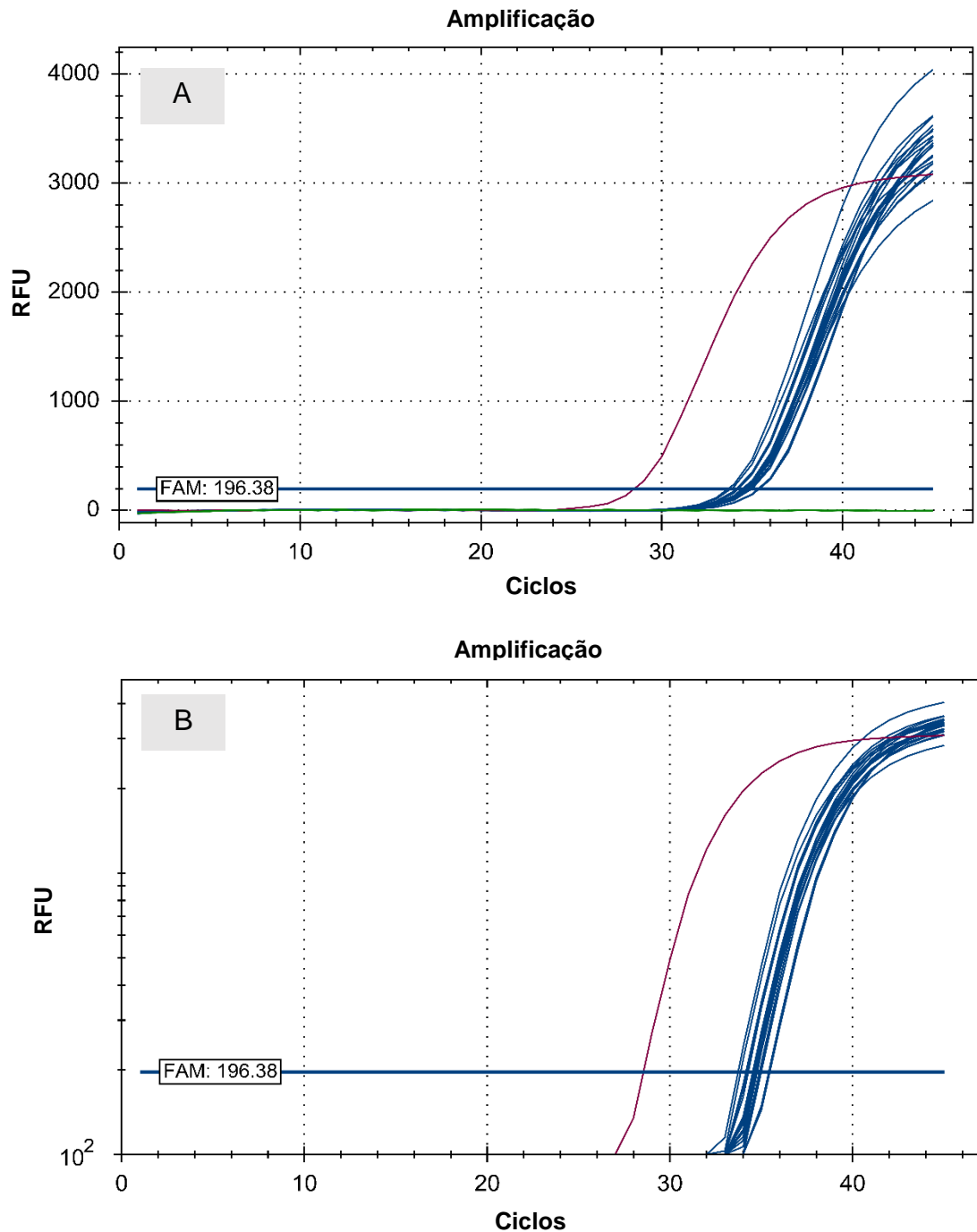


**Figura 28. Confirmação do limite de detecção para matriz biológica LEF contaminada experimentalmente com FMDV e inativada por TRIZOL®**



Fonte: Da autora. Gráfico de amplificação do alvo da RT-qPCR para suspensões virais Illb.T. Curva em roxo: controle positivo. (A) Escala linear; (B) Escala logarítmica.

**Figura 29. Confirmação do limite de detecção para matriz biológica LEF contaminada experimentalmente com FMDV e inativada por MagMax™ CORE Lysis Solution**



Fonte: Da autora. Gráfico de amplificação do alvo da RT-qPCR para suspensões virais IIIb.M. Curva em roxo: controle positivo. (A) Escala linear; (B) Escala logarítmica.

De acordo com o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos, o LD não deve ser confundido com o ponto de corte da prova, visto que existe a probabilidade de amostras serem positivas abaixo dessa concentração. Kralik e Ricchi (2017) confirmam este conceito, ao afirmarem que o LD não é um valor limite, e, portanto, amostras investigadas que amplificam com valores de *Ct* acima do *Ct* do LD, não podem ser consideradas automaticamente negativas. Concentrações de ácido nucléico abaixo do LD são absolutamente válidas em termos da presença do microrganismo; contudo, a probabilidade de detecção é menor do que 95% ou qual seja o percentual de confiança estabelecido para aquele método.

Embora uma PCR seja teoricamente capaz de detectar uma única cópia do alvo, é reportado um número de cópias de 2 a 10 como o nível de alvo mais baixo que pode ser quantificado de forma confiável em aplicações de PCR em tempo real. Isso limita a utilidade do valor de *Ct* como uma medida direta de sensibilidade (REAL-TIME PCR handbook, 2012).

Estabelecer o LD para o método de diagnóstico auxilia a tomada de decisão no caso de amostras que amplificam próximas ou além do ciclo determinado como limite. Uma reação de PCR em tempo real semi-quantitativa (aquela na qual busca-se a determinação de *Ct*) estabelecida e validada, apresenta certa faixa de resultado em que é difícil a conclusão entre o diagnóstico positivo ou negativo. A partir do *Ct* máximo em que uma amostra é certamente positiva, há uma faixa de resultado indeterminado, na qual não se pode discernir entre a presença do alvo ou de subprodutos da PCR. Para sanar tais situações, busca-se utilizar ferramentas complementares para que o diagnóstico seja estabelecido. No LFDA-MG, a repetição da amostra em triplicata na tentativa de eliminar a possibilidade de amplificação inespecífica, a repetição da amostra diluída para eliminação da possibilidade de inibição da reação e/ou a PCR com outros alvos do genoma do vírus, são medidas previstas. No caso de amostras de LEF especificamente, procede-se também à técnica de isolamento viral para o FMDV.

Tendo isso em vista, considerar o LD como o *Ct* da concentração viral que apresentou no mínimo 20 resultados positivos em 21 (o que corresponde a 95%) é uma estimativa conservadora, como apontado por Nutz e colaboradores (2011), e busca justamente estabelecer um valor robusto para o LD. Uma

estimativa mais precisa poderia ser obtida por um próximo estágio, usando intervalos de concentração mais estreitos entre as suspensões virais. Contudo, em virtude da inviabilidade temporal e de recursos que este teste demandaria, não se procedeu a tal abordagem.

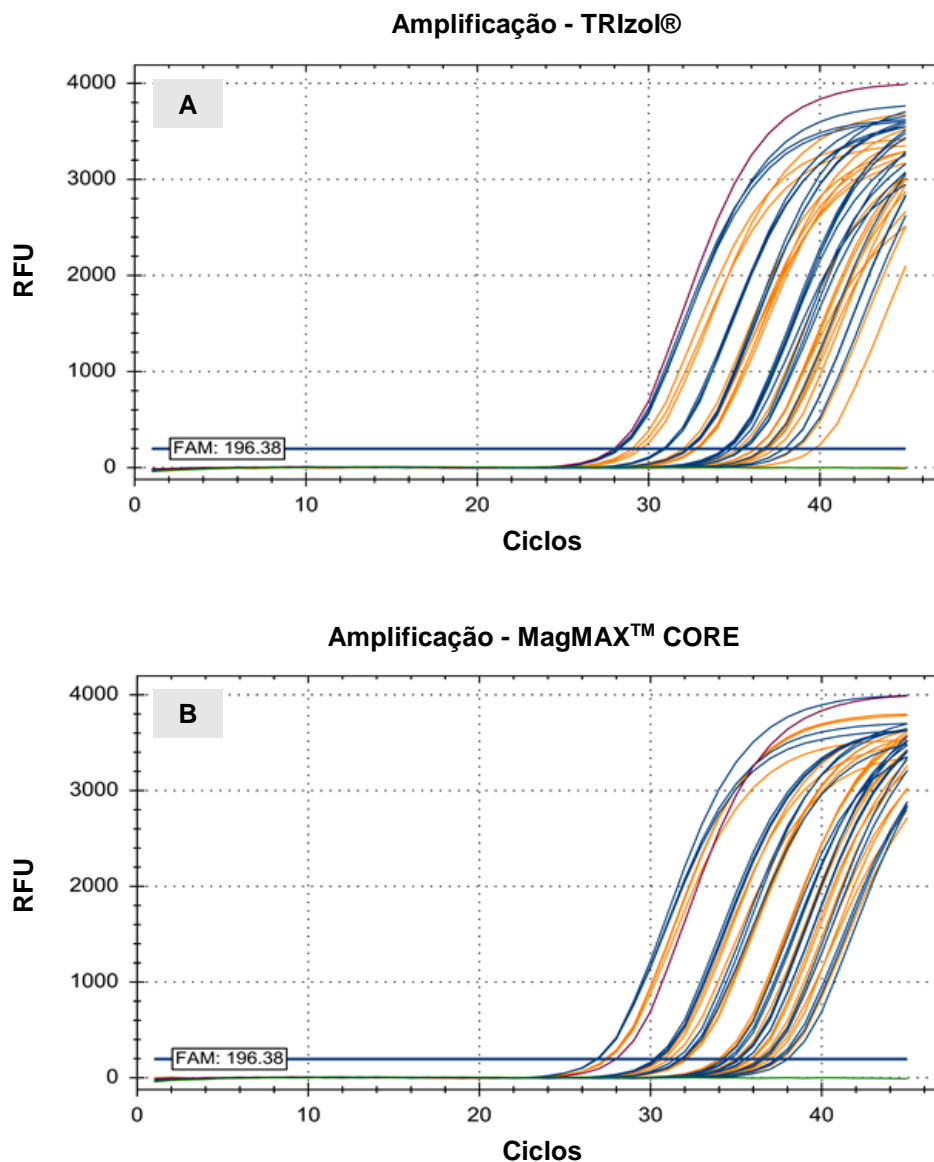
### **5.2.2 Verificação do efeito matriz**

O efeito da interferência da matriz biológica (efeito matriz) foi avaliado através da comparação das curvas de amplificação da etapa de determinação do LD.

Das suspensões virais inativadas por TRIzol®, as contaminações experimentais em meio MEM amplificaram com *Ct* mais baixos do que as contaminações da matriz biológica LEF; já para as suspensões virais inativadas por MagMax™ CORE, não foi observado este padrão em todos os pontos de concentração, ou seja, o *Ct* de suspensões virais em matriz biológica LEF em alguns casos, foi menor que o *Ct* da mesma concentração viral em MEM.

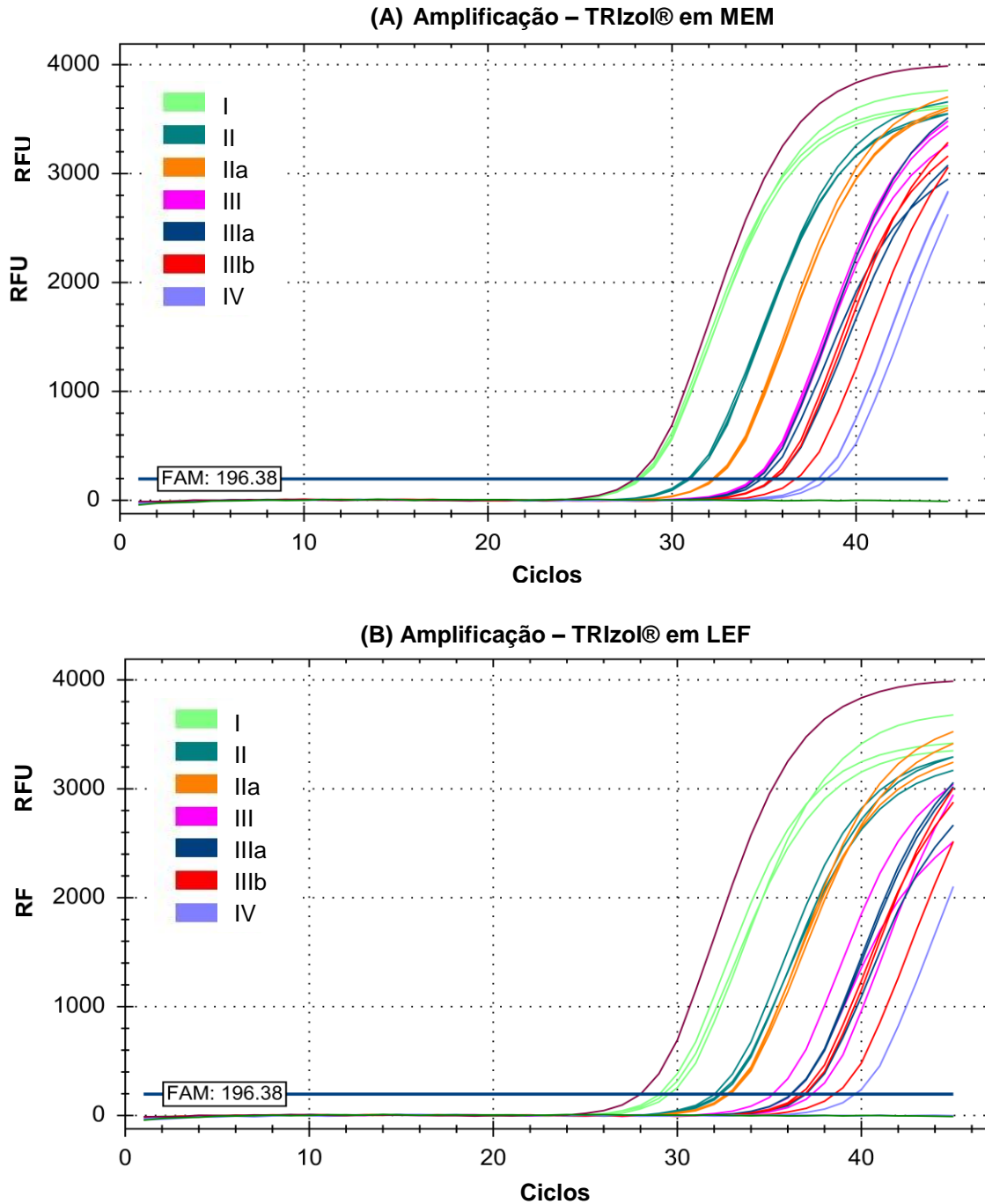
A comparação visual (conforme prevê o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos) entre as duas curvas de amplificação do material genético na presença e ausência de matriz biológica LEF (Figura 30), indica que, para o grupo de amostras inativadas por TRIzol® houve uma tendência de amplificação mais tardia na presença da matriz biológica LEF, enquanto que para o grupo de amostras inativadas por MagMax™ CORE *Lysis Solution*, não foi possível uma percepção conclusiva. As Figuras 31 e 32, por sua vez, correspondem igualmente às curvas de amplificação do material genético na presença e ausência de matriz biológica LEF, porém, enfatizando cada triplicata de concentração.

**Figura 30: Gráfico de amplificação da RT-qPCR para FMDV de amostras positivas tratadas (A) por TRIzol® e (B) por MagMAX™ CORE Lysis Solution**



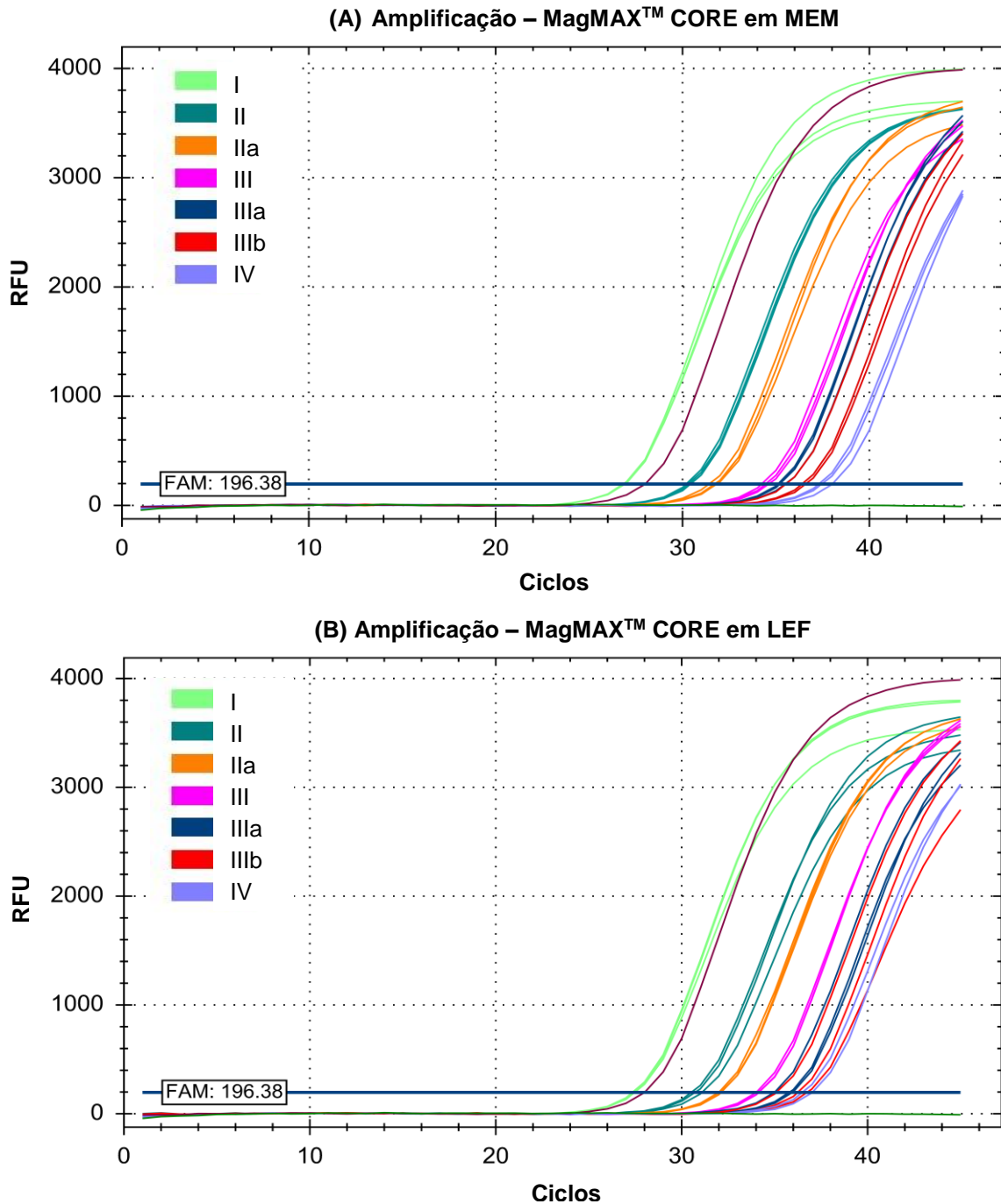
Fonte: Da autora. Kit RT-qPCR QuantiFast Probe (Qiagen, Alemanha). Termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA). Concentrações em log na base 10: 4,1 (I), 3,1 (II), 2,8 (IIa), 2,1 (III), 1,8 (IIIa), 1,7 (IIIb) e IV (1,1) aplicadas em triplicata cada. Curva em roxo: controle positivo; Curvas em verde: controle negativo; Curvas em azul: amostras em MEM; Curvas em alaranjado: amostras em LEF.

**Figura 31: Gráfico de amplificação da RT-qPCR para FMDV de amostras positivas tratadas por (A) TRizol® em MEM e em (B) matriz biológica LEF**



Fonte: Da autora. Kit RT-qPCR QuantiFast Probe (Qiagen, Alemanha). Termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA). Concentrações em log na base 10: 4,1 (I), 3,1 (II), 2,8 (IIa), 2,1 (III), 1,8 (IIIa), 1,7 (IIIb) e 1,1 (IV) aplicadas em triplicata cada. Curva em roxo: controle positivo; Curva em verde: controle negativo.

**Figura 32: Gráfico de amplificação da RT-qPCR para FMDV de amostras positivas tratadas por MagMax™ CORE Lysis Solution em (A) MEM e em (B) matriz biológica LEF**



Fonte: Da autora. Kit RT-qPCR QuantiFast Probe (Qiagen, Alemanha). Termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA). Concentrações em log na base 10: 4,1 (I), 3,1 (II), 2,8 (IIa), 2,1 (III), 1,8 (IIIa), 1,7 (IIIb) e 1,1 (IV) aplicadas em triplicata cada. Curva em roxo: controle positivo; Curva em verde: controle negativo.

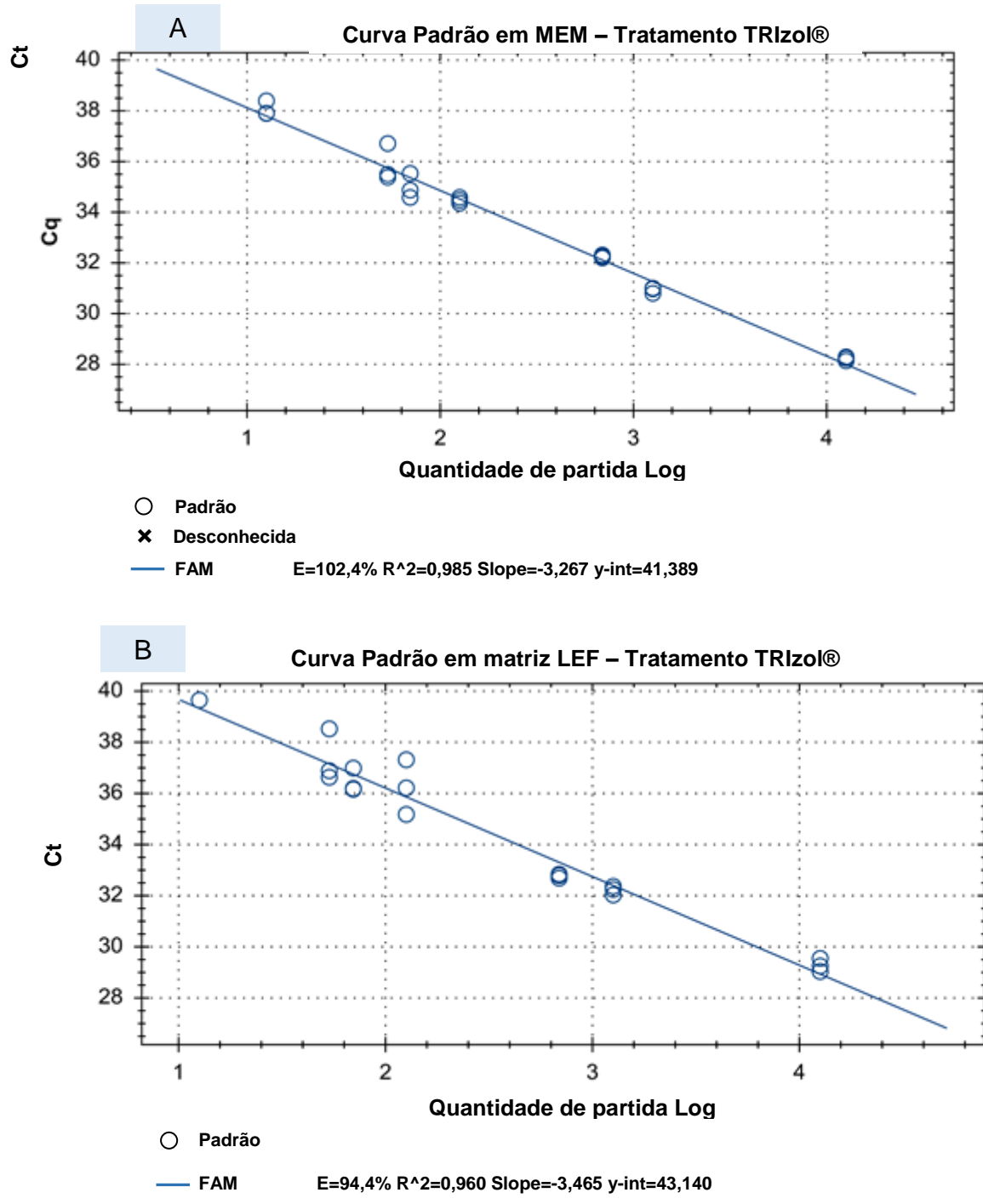
### **5.2.3 Determinação da eficiência da RT-qPCR**

A determinação da eficiência da RT-qPCR foi calculada pelo Software BioRad CFX Manager™ 3.1 do equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BIORAD, USA) seguindo o protocolo para RT-qPCR descrito nas tabelas 1 e 2.

Para o grupo de amostras tratadas por TRIzol®, correspondeu a 102,4% com  $R^2$  de 0,985 para contaminação viral em MEM, e a 94,4% e  $R^2$  de 0,960 para contaminação viral em matriz biológica LEF (Figura 33).



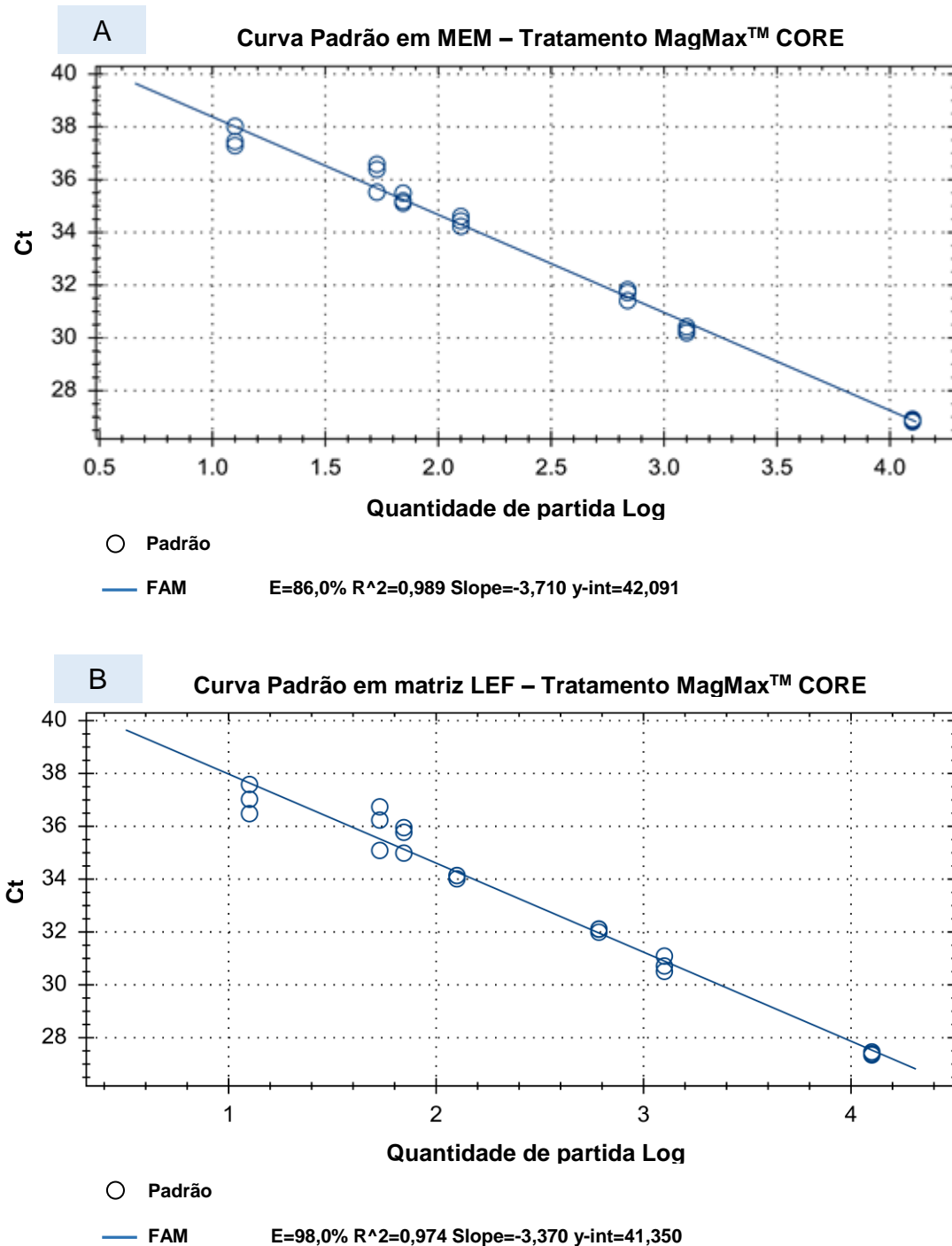
Figura 33: Curva de eficiência da RT-qPCR para FMDV (CALLAHAN et al., 2002) de (A) amostras positivas em MEM e (B) amostras positivas em matriz, tratadas por TRIZOL®.



Fonte: Da autora. Kit RT-qPCR QuantiFast Probe (Qiagen, Alemanha). Termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA).

Para o grupo de amostras tratadas por MagMAX™ CORE *Lysis Solution* a eficiência da reação correspondeu a 86,0% e  $R^2$  de 0,989 para contaminação viral em MEM, e a 98,0% e  $R^2$  de 0,974 para contaminação viral em matriz biológica LEF (Figura 34).

**Figura 34: Curva de eficiência para FMDV (CALLAHAN et al., 2002) de (A) amostras positivas em MEM e (B) amostras positivas em matriz, tratadas por MagMax™ CORE Lysis Solution**



Fonte: Da autora. Kit RT-qPCR QuantiFast Probe (Qiagen, Alemanha). Termociclador CFX96 Touch™ Real Time PCR Detection System (BIO-RAD, EUA).

Observou-se a perda de eficiência da técnica quando o RNA do agente se encontrava diluído na matriz biológica LEF para amostras inativadas por TRIzol®, e o ganho de eficiência da técnica no caso de amostras inativadas por MagMax™ CORE *Lysis Solution*. Tal constatação do tratamento com MagMax™ CORE *Lysis Solution* pode refletir alguma interferência negativa do meio MEM no resultado da RT-qPCR, tendo em vista sua composição por diversos sais e substâncias (solução de vitaminas, bicarbonato de sódio, caldo triptose fosfato, glicose, Meio Essencial Mínimo com sais de Earle e Hepes). Contudo, não se procedeu a tais investigações e adotou-se conduzir os demais testes na presença da matriz biológica LEF, uma vez que ela representa as amostras de campo que serão analisadas na rotina do laboratório.

Embora as taxas de amplificação da reação de RT-qPCR em matriz biológica LEF para ambos os tratamentos tenham sido satisfatórias, o coeficiente de determinação  $R^2$  das curvas padrão ficou aquém do valor tido como ideal para garantia de precisão do resultado de acordo com o Manual de Verificação de Desempenho de Métodos. O valor de  $R^2$  representa quão bem os dados do experimento estão ajustados ao modelo de regressão linear (REAL-TIME PCR handbook, 2012). A linearidade, por sua vez, fornece uma medida da variabilidade entre as repetições do ensaio e se a eficiência da amplificação é a mesma para diferentes números de cópias do modelo inicial. Assim, uma diferença significativa nos valores de  $C_t$  observados entre as réplicas diminuirá o valor de  $R^2$  (REAL-TIME PCR: Applications Guide, [s.d.]). Este valor também será afetado se os pontos de concentração da curva tiverem sofrido impacto de um erro mensurável em determinada etapa que precede a aplicação em RT-qPCR.

O Manual de Verificação de Desempenho de Métodos considera a eficiência um parâmetro avaliador da reação de RT-qPCR isoladamente. Por isso, embora tenha como critério de aceitação um coeficiente de determinação maior que 0,99, os resultados obtidos não invalidaram os testes, pois intrinsicamente à avaliação da eficiência das curvas padrão, constaram fontes de variação provenientes das etapas de contaminação das amostras, inativação e extração de ácidos nucléicos. Para uma avaliação direta da eficiência da curva, a análise com um controle positivo sintético poderia ser realizada, porque eliminaria as variáveis provenientes de etapas anteriores. Contudo, em

consonância com os objetivos deste trabalho, a avaliação da eficiência da RT-qPCR que considerasse as etapas do diagnóstico laboratorial foi a mais indicada.

Além disso, é importante observar que devido à distribuição estatística, a variação de *Ct* tende a aumentar quanto mais baixa forem as concentrações iniciais de ácido nucléico. Alto nível de variação de *Ct* é reportado quando as quantidades alvo se aproximam de uma cópia (valores de *Ct* de entre 34 e 40 (GUIDE to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR, 2004), portanto, valores de *Ct* nesta faixa, darão origem a uma precisão mais pobre e, conseqüentemente, menor capacidade para detectar alterações de aumento exponencial do *amplicon*. Este trabalho teve por objetivo a avaliação da faixa de resposta crítica para a técnica de diagnóstico molecular: aquela em que o teste pode apontar um resultado inconclusivo. Com tais pontuações em vista, os coeficientes de correlação alcançados foram considerados satisfatórios.

#### 5.2.4 Determinação da repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, incerteza expandida e nível de significância das variâncias do método diagnóstico molecular de FMD empregando o kit QuantiFast e termociclador CFX96, tendo por variável o processo de inativação viral (TRIZOL® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution)

As estimativas obtidas nesta etapa foram realizadas através do *Software Microsoft Excel* (Versão 2013) em planilha sob catalogação interna no LFDA-MG FORM DLAB\_046\_003.

As fontes de variação do plano de amostragem adotado para estimativa da repetibilidade e reprodutibilidade foram avaliadas sob o modelo hierárquico apresentado pela expressão

$$y_{ijk} = m + d_i + a_{j(i)} + p_{k(ij)} + e_{r(ijk)}$$

onde  $y$  é o valor do  $Ct$  obtido;  $m$  é o  $Ct$  médio geral;  $d$  é o efeito do dia,  $i = 1,2,3$ ;  $a$  é o efeito do analista,  $j = 1,2$ ;  $p$  é o efeito da parcela experimental,  $k = 1,2,\dots, p_j = 7$ ;  $e$  é o erro aleatório devido à repetibilidade,  $r=1,2$ . (BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO., 2015).

Para ambos os procedimentos de inativação viral, as porcentagens de contribuição da variância da repetibilidade na variância total, ultrapassou o máximo estabelecido de 5%, indicando a necessidade de adequação do sistema de medidas ao experimento: para tratamento por TRIZOL®, representou 10,76% e por *MagMax™ CORE Lysis Solution*, 7,33%.

As variâncias ( $\sigma^2$ ) do erro de medida e da reprodutibilidade intralaboratorial por sua vez, indicaram a aceitabilidade do sistema de medidas utilizado para ambos os métodos de inativação.  $\sigma^2_{\text{erro de medida}}$  foi igual a 27,26% para inativação por TRIZOL® e 17,32% para inativação por *MagMax™ CORE Lysis Solution*. A  $\sigma^2_{\text{reprodutibilidade}}$ , por sua vez, correspondeu respectivamente a 16,49% e 9,99%, enquadrando-se no critério esperado de no máximo 25%.

A incerteza expandida foi calculada utilizando o fator de abrangência  $K = 2$  sendo equivalente a 0,94 para o tratamento por TRIZOL® e 0,64 para tratamento por *MagMax™ CORE Lysis Solution* com admissão de 95% de chance de conter o verdadeiro valor do mensurando. O Manual de Verificação de Desempenho de Métodos não prevê incerteza máxima aceitável.

A média total do mensurando ( $C_t$ ) para o tratamento por TRIzol® foi igual a  $34,60 \pm 0,94$ , valor este, maior do que a média total de  $32,58 \pm 0,64$  relativa ao protocolo de inativação por MagMax™ CORE *Lysis Solution*. Esta menor sensibilidade analítica para o método de inativação por TRIzol® pode ser advinda de mais etapas de manipulação da amostra durante a extração de ácidos nucleicos e da criticidade da etapa de separação da fase aquosa contendo o RNA, que se dá por processo de pipetagem. A recuperação do material genético relativa a este passo analítico não foi avaliada, e pode não ser 100%. Além disso, este passo pode acarretar na transferência de resquícios de TRIzol®, que consistirão em interferentes da reação de RT-qPCR. Esta interferência é relatada na literatura, como por exemplo por Bustin e colaboradores, (2009) que apontaram o fenol residual como fator influenciador na razão entre as medidas de absorbância de ácidos nucleicos sobre a absorbância de proteínas (A260/A280), um indicador sensível da pureza de RNA.

Os resultados da análise de variância da metodologia que empregou o kit QuantiFast e termociclador CFX96, estão contidos nas Tabelas 14 e 15, respectivamente para inativação por TRIzol® e por MagMAX™ CORE *Lysis Solution*. Os componentes da variância total atribuída a ambos os métodos diagnósticos avaliados, indicou que a fonte de variação *analistas* apresentou o mesmo desempenho, sendo o *p-value* relativo à inativação por TRIzol®, igual a 0,94 e por MagMax™ CORE *Lysis Solution*, igual a 0,42 para o nível de significância de 0,05. Já a fonte de variação *dia*, por sua vez, apresentou diferença significativa. É importante lembrar que *dia* representa a variação proveniente do preparo da amostra, desde a etapa de contaminação da matriz biológica LEF com a suspensão viral até sua aplicação em mix de RT-qPCR, e portanto, o nível de significância é aceitável.

Tabela 14. ANOVA para tratamento por TRIZOL® avaliado em 3 dias, por 2 analistas e mesmos equipamento e kit de RT-qPCR

Fonte de variação	Graus de liberdade (gl)	SQ	QM	Fo <sup>(1)</sup>	P(F>Fc) <sup>(2)</sup>	Conclusão <sup>(3)</sup>
Concentração	6	228,9577	38,160	22,044	0,000000	sign
Analistas	7	3,7301	0,533	0,308	0,944352	ns
Dias	28	48,4688	1,731	5,597	0,000000	sign
Modelo	41	281,1565				
Erro	84	25,979	0,30927 62			
total	125	307,136	2,457			

(1) Valor observado para o teste F de Fisher-Snedecor; (2)  $P(F_o > F_c)$  = probabilidade do valor  $F_o > F_c$ , que é o valor tabelado de F com n graus de liberdade no numerador e m graus de liberdade no denominador; (3) “ns” indica não significativo; não se rejeita  $H_0$  ao nível de probabilidade de 5%; “sign” indica significativo; rejeita-se  $H_0$  ao nível de probabilidade de 5%.

Tabela 15. ANOVA para tratamento por MagMax™ CORE Lysis Solution avaliado em 3 dias, por 2 analistas, e mesmos equipamento e kit de RT-qPCR

Fonte de variação	Graus de liberdade (gl)	SQ	QM	Fo <sup>(1)</sup>	P(F>Fc) <sup>(2)</sup>	Conclusão <sup>(3)</sup>
Concentração	6	177,3669	29,561	40,826	0,000000	sign
Analistas	7	5,2949	0,756	1,045	0,423516	ns
Dias	28	20,2740	0,724	5,055	0,000000	sign
Modelo	41	202,9358				
Erro	83	11,890	0,1432490			
total	124	214,825	1,732			

(1) Valor observado para o teste F de Fisher-Snedecor; (2)  $P(F_o > F_c)$  = probabilidade do valor  $F_o > F_c$ , que é o valor tabelado de F com n graus de liberdade no numerador e m graus de liberdade no denominador; (3) “ns” indica não significativo; não se rejeita  $H_0$  ao nível de probabilidade de 5%; “sign” indica significativo; rejeita-se  $H_0$  ao nível de probabilidade de 5%.

A Tabela 16 reúne os resultados alcançados para os parâmetros avaliados na verificação de desempenho dos métodos diagnósticos de Febre Aftosa cuja inativação viral ocorreu por TRIZOL® ou por MagMAX™ CORE Lysis Solution, tendo por fonte de variação a parcela experimental, o dia de análise e o analista, empregando-se o Kit de RT-qPCR *QuantiFast* e o equipamento CFX96.



Tabela 16. **Parâmetros avaliados na verificação de desempenho dos métodos diagnósticos moleculares por RT-qPCR para FMDV, tendo por variável o processo de inativação viral**

Parâmetro avaliado	Critério de aceitação	TRIZOL®	MagMAX™ CORE
<b>LD (TCID<sub>50</sub>/50µL)</b>	-	10 <sup>1,7</sup>	10 <sup>1,7</sup>
<b>Eficiência em matriz (%)</b>	90 a 100	94,4	98,0
	R <sup>2</sup> > 0,99	0,96	0,97
<b>σ<sup>2</sup> Repetibilidade (%)</b>	≤ 5%	10,76	7,33
<b>σ<sup>2</sup> Reprodutibilidade (%)</b>	≤ 25%	16,49	9,99
<b>σ<sup>2</sup> Erro de medida (%)</b>	≤ 30%	27,26	17,32
<b>Ct médio</b>	-	34,61	32,58
<b>R<sup>2</sup></b>	Ideal: 100	91,54	94,98
<b>Incerteza expandida U</b>	-	0,94	0,64
<b>Componentes da σ<sup>2</sup> (%)</b>			
Parcela experimental		72,74	82,5
Analista	-	0,00	0,19
Dia	-	16,49	9,99

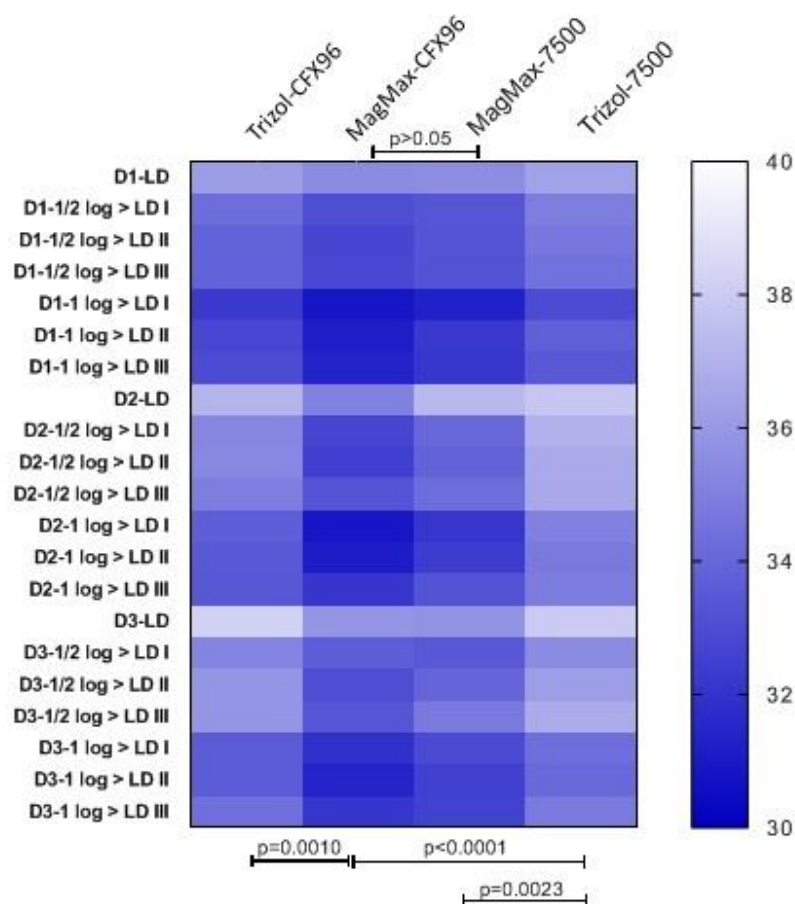
LD = Limite de Detecção; σ<sup>2</sup> = variância; - = não se aplica; R<sup>2</sup> = coeficiente de explicação das componentes da incerteza; Resultados alcançados por 7 amostras por dia empregadas em 3 dias de análises, por 2 analistas, utilizando-se kit *QuantiFast* e termociclador CFX96.

Em relação à variação do kit de RT-qPCR e do equipamento termociclador prevista no Manual de Verificação de Desempenho de Métodos, foram avaliadas as amostras do analista 1 da seguinte forma: para a variação do termociclador, foram empregados os equipamentos *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (BIO-RAD, EUA) e *7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems™, EUA) e mesmo kit de RT-qPCR *Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha), em 3 dias. Para a variação do kit de RT-qPCR, foram empregados os kits *Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha) e *GoTaq® Probe 1- Step RT-qPCR System* (Promega, EUA) em mesmo termociclador CFX96, em 3 dias. A avaliação destas variáveis se deu de forma complementar àquela apresentada na Tabela 16.

A variação do termociclador permitiu considerar a média de *Ct* apresentada por cada equipamento, sendo que as amostras tratadas por TRIZOL® submetidas ao CFX96 apresentaram média geral de 34,61 *Ct* e as amostras submetidas ao 7500, apresentaram média geral de 35,32 *Ct*. Já as amostras tratadas por MagMAX CORE™ *Lysis Solution* submetidas ao CFX96 apresentaram média geral de 32,70 *Ct* e as amostras submetidas ao 7500, apresentaram média geral de 33,49 *Ct*. Estes dados não puderam, contudo, ser

considerados no modelo estatístico apresentado no item 5.3 porque não houve o grupo de amostras avaliadas no equipamento 7500 e kit GoTaq® que permitisse a comparação com o grupo de amostras no equipamento CFX96 e kit GoTaq®. Os resultados de média de  $C_t$  relatados acima, indicaram melhor desempenho das amostras tratadas por MagMAX CORE™ *Lysis Solution*, independente do termociclador utilizado. A representação gráfica *Heatmap* (Figura 35) mostra em escala de intensidade de cor, os valores médios de  $C_t$  para os três grupos de concentração analisados em três dias de análise. A primeira e segunda coluna representam os dados obtidos pelo uso do CFX-96, das amostras inativadas respectivamente por TRIzol® e por MagMAX™ CORE. Nota-se coloração mais intensa na segunda coluna, indicando menores valores de  $C_t$  para cada ponto de concentração. A terceira e quarta colunas são relativas ao emprego do termociclador 7500, para amostras inativadas respectivamente por MagMAX™ CORE e por TRIzol®. Mais uma vez, nota-se coloração mais intensa (indicando menores médias de  $C_t$ ) na coluna referente ao tratamento por MagMAX™ CORE.

**Figura 35. Heatmap para valores de Ct empregando-se variação do termociclador em amostras inativadas por MagMAX CORE™ Lysis Solution versus amostras inativadas por TRIZOL®**



Fonte: Da autora. D1, D2, D3 indicam os dias de análise; LD, ½ log>LD e 1 log>LD indicam as concentrações das amostras; I, II e III indicam as replicatas de cada concentração.

A variação do kit de RT-qPCR por sua vez, permitiu a análise estatística descrita no item 5.3. a seguir, visto que haviam os grupos de comparação “mesmo equipamento CFX96 variando-se o kit de RT-qPCR” para ambos os métodos de inativação viral.

### **5.3 Avaliação estatística comparativa do desempenho do método diagnóstico molecular de FMD empregando o termociclador CFX96, tendo por variáveis o processo de inativação viral (TRIzol® versus MagMAX™ CORE Lysis Solution) e o kit de RT-qPCR (QuantiFast versus GoTaq®)**

Com os mesmos dados obtidos do delineamento experimental indicado no Manual de Verificação de Desempenho de Métodos, procedeu-se, adicionalmente, à outra abordagem comparativa: avaliação de um método diagnóstico (inativação por TRIzol®) frente ao outro (inativação por MagMAX™ CORE) por um modelo matemático que os abrangesse em conjunto, diferentemente da comparação até agora exposta e resumida na Tabela 16, na qual os dados do protocolo TRIzol® foram avaliados separadamente do dados do protocolo MagMAX™ CORE.

O objetivo foi avaliar se os processos de inativação viral diferem estatisticamente na resposta final do método diagnóstico (valor de *Ct*). As análises desta etapa foram realizadas pelo *Software R* (Versão 4.0.2).

A análise exploratória se deu pela estatística descritiva. Para as situações em que não houve determinação de curva de amplificação, o *Ct* 40 foi adotado. As quatro variáveis de influência consideradas foram, portanto: (i) *dia*; (ii) *parcela experimental* (parc. exp); (iii) *kit de RT-qPCR* e (iv) *método de inativação viral*. A variável *analista* foi desconsiderada uma vez que as análises descritas em 5.2.4 indicaram que ela é não significativa. Utilizou-se portanto, dados do analista 1, apenas.

Inicialmente, foram utilizadas técnicas de análise descritiva dos dados para verificação de um comportamento prévio de tais variáveis com relação ao *Ct*. A análise de frequências das variáveis adotadas, indicou o mesmo tamanho de amostra para todas as categorias de cada uma das variáveis, conforme apresentado na tabela 17, o que permite uma comparação balanceada (não tendenciosa).

Tabela 17. Estatísticas descritivas das variáveis *método, dia, parcela experimental e kit de RT-qPCR*

Variável	Categoria	Frequência (%)
Método	TRIZOL®	126(50)
	MagMAX™	126(50)
Dia	1	84(33)
	2	84(33)
	3	84(33)
Parcela experimental	LD	36(14)
	½ log LD I	36(14)
	½ log LD II	36(14)
	½ log LD III	36(14)
	1 log LD I	36(14)
	1 log LD II	36(14)
	1 log LD III	36(14)
Kit RT-qPCR	QuantiFast	126(50)
	GoTaq®	126(50)

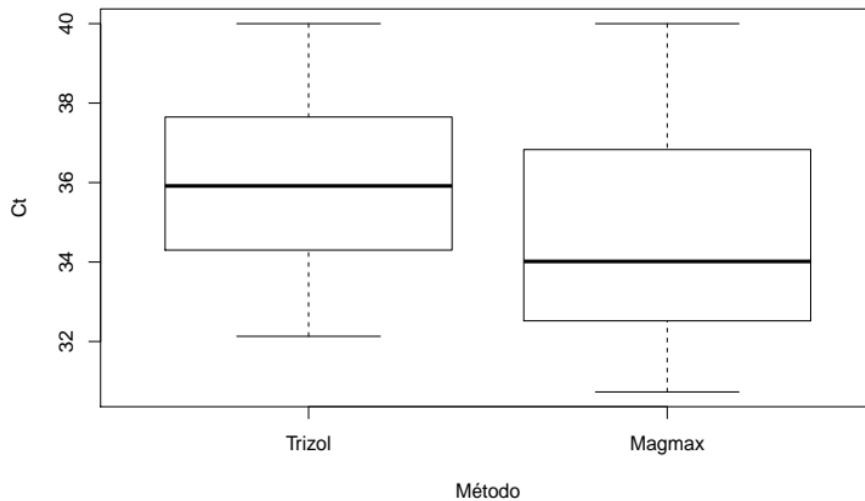
A Tabela 18 resume as análises descritivas para mínimo (Mín), 1º quartil (Q1), média, mediana, 3º quartil (Q3) e máximo (Máx) de *Ct*. Valores de média próximos da mediana são também um indicativo de que os dados são simétricos (estão balanceados). Nota-se que os valores mínimos observados para tratamento por TRIZOL® e MagMax™ CORE *Lysis Solution* foram respectivamente 32,13 e 30,73. Com respeito a média, o método que apresentou menor valor foi MagMax™ CORE, o que por sua vez, é indicativo de maior sensibilidade diagnóstica comparativamente ao método cuja inativação foi feita por TRIZOL®. As Figuras 36 a 38 são representações gráficas desta característica.

Tabela 18: Análise descritiva da variável resposta *Ct* estratificada por método de inativação utilizado

Método	Mín	Q1	Média	Mediana	Q3	Máx
TRIZOL®	32,13	34,3	36,18	35,92	37,64	40
MagMAX™ CORE	30,73	32,52	34,65	34,02	36,78	40

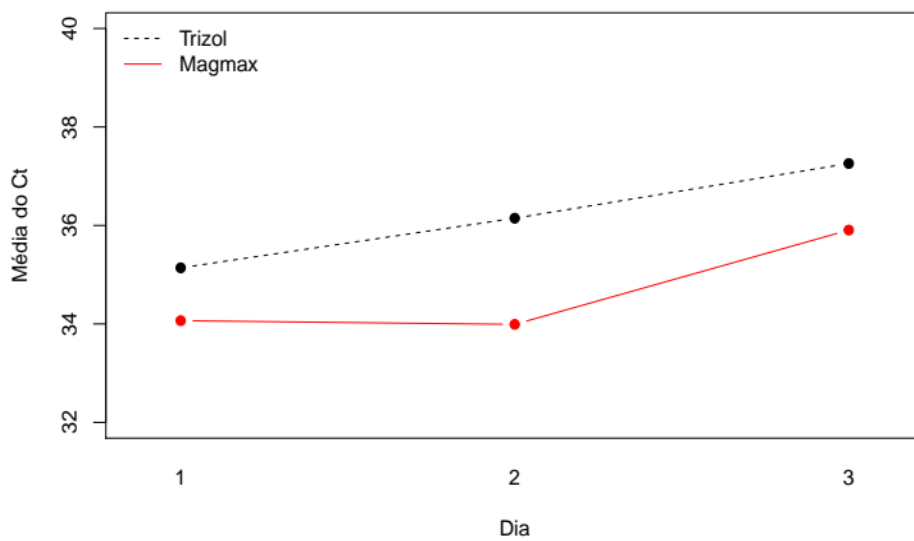
Mín = mínimo , Q1 = 1º quartil, Q3 = 3º quartil . Máx = máximo

**Figura 36. Gráfico Boxplot para mediana das respostas ( $C_t$ ) de inativação viral por TRIZOL® e por MagMax™ CORE Lysis Solution**



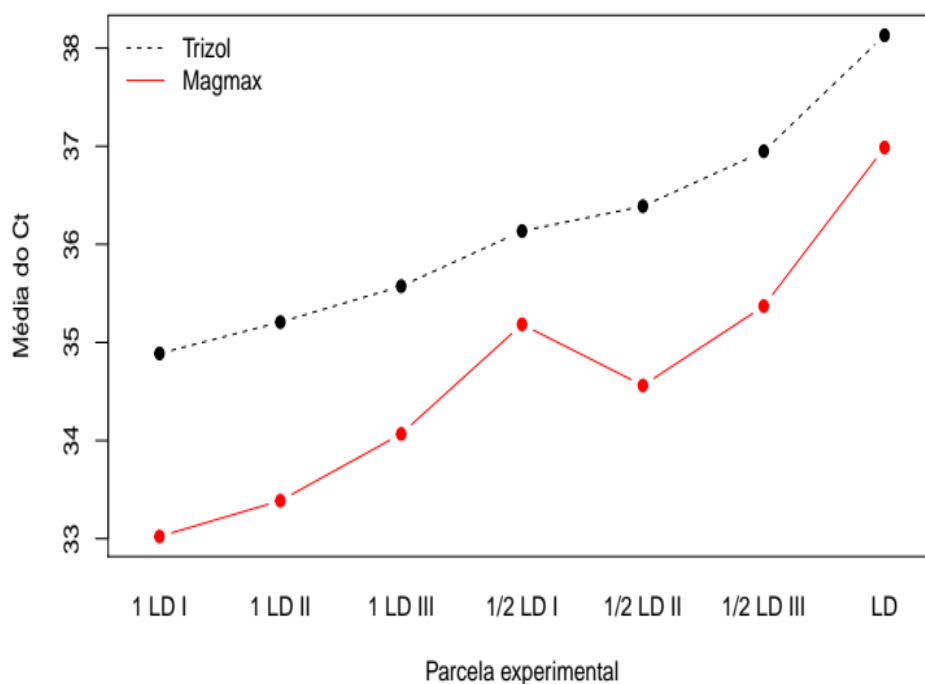
Fonte: Da autora.

**Figura 37: Médias de  $C_t$  dos métodos de inativação avaliados em função dos dias de análise**



Fonte: Da autora.

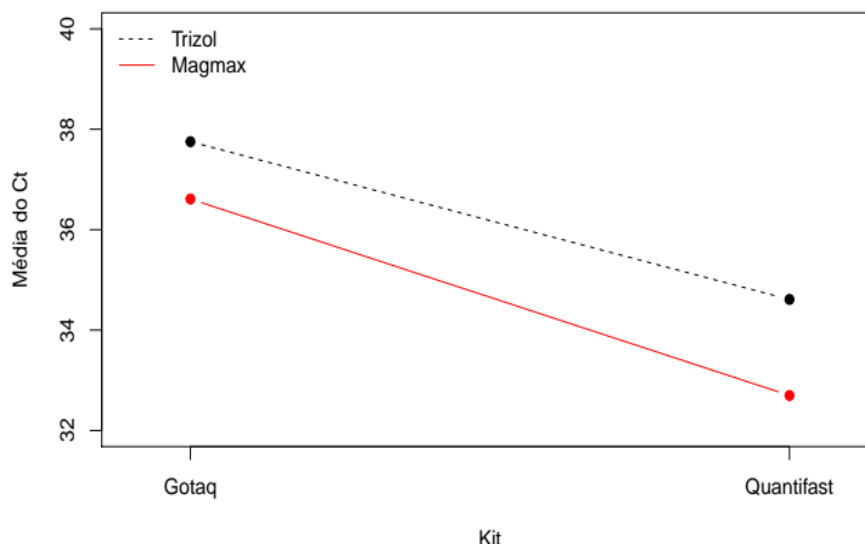
**Figura 38: Médias de Ct dos métodos de inativação avaliados em função das parcelas experimentais**



Fonte: Da autora.

A Figura 39 apresenta médias de Ct para os métodos de inativação viral em relação aos kits de RT-qPCR (dados de um só analista, termociclador BIO-RAD, em três dias de análise). Mais uma vez, as médias foram maiores para TRizol® comparativamente ao tratamento por *MagMax™ CORE Lysis Solution*. Para ambos os métodos, foi observada redução de Ct quando do uso do *Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha) comparado ao *GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega, EUA), indicando um melhor desempenho do primeiro nas condições de análise testadas.

**Figura 39: Médias de Ct dos métodos de inativação avaliados em função dos diferentes kits de RT-qPCR**



Fonte: Da autora.

Tendo em vista o resultado da análise exploratória, para a modelagem matemática, foram consideradas as variáveis *método*, *dia*, *parcelas experimentais* e *kit de RT-qPCR*, pois todas elas influenciaram os valores de *Ct*. Os gráficos representados nas figuras 37 a 39 indicaram que não houve interação entre suas categorias (caso fosse presente, uma interação seria indicada pelo cruzamento das retas representadas). Dessa forma, os próximos testes foram conduzidos considerando-se apenas o efeito individual de cada variável.

Procedeu-se a uma análise do modelo de ANOVA, e foram estimadas as médias para os dois métodos considerando o melhor modelo estatístico. A modelagem ANOVA é traduzida pela expressão:

$$y_{ijrp} = \mu + m_i + p_j + d_r + k_p + \varepsilon_{ijrp}$$

em que  $y$  é o valor de *Ct*,  $i = 1,2$ ;  $j = 1,2, \dots, 7$ ;  $r = 1,2,3$ ;  $p = 1,2$ ,  $\mu$  é o *Ct* médio geral,  $m$  é o efeito do método,  $p$  é o efeito da parcela experimental,  $d$  é o efeito do dia,  $k$  é o efeito do kit de RT-qPCR, e  $\varepsilon$  é o erro aleatório da análise devido a repetibilidade.



Tabela 19: ANOVA para os dados de Ct obtidos pelo emprego de variáveis nas metodologias diagnósticas em estudo

Fator de variação	GL	SQ	QM	F <sub>c</sub>	P-valor
Fator(Método)	1	147,0	147,0	135,90	<0,001
Fator(Dia)	2	180,0	90,0	83,21	<0,001
Fator(Parc. Exp)	6	322,1	53,7	49,65	<0,001
Fator(Kit RT-qPCR)	1	784,0	784,0	724,95	<0,001
Resíduos	241	260,6	1,1		

GL = graus de liberdade; SQ= soma quadrática; QM = quadrado médio; F<sub>c</sub> = F calculado

A Tabela 19 reúne os resultados do modelo ANOVA. Os valores de p-valor do teste indicaram que todas as variáveis do modelo apresentam diferença estatisticamente significativa na comparação do processo de inativação por TRizol® e MagMax™ CORE *Lysis Solution*, e que para *dia*, *parcela experimental* e *kits de RT-qPCR*, há pelo menos uma categoria deles que difere das demais. Portanto, procedeu-se ao uso do modelo de regressão linear múltiplo para estudar as estimativas médias de cada efeito, bem como a uma análise geral através da estimativa das médias dos tratamentos, afim de estabelecer comparação da sensibilidade diagnóstica obtida. O modelo de regressão múltiplo foi denotado por:

$$\begin{aligned}
 E(Y_{ijrp}) = & \beta_0 + \beta_1 \text{Método}(\text{Magmax}) + \beta_2 \text{Dia}(\text{Dia2}) + \beta_3 \text{Dia}(\text{Dia3}) + \beta_4 \text{Parcelas}(1\text{LDII}) \\
 & + \beta_5 \text{Parcelas}(1\text{LDIII}) + \beta_6 \text{Parcelas}(1/2\text{LDI}) + \beta_7 \text{Parcelas}(1/2\text{LDII}) \\
 & + \beta_8 \text{Parcelas}(1/2\text{LDIII}) + \beta_9 \text{Parcelas}(\text{LD}) + \beta_{10} \text{Kit}(\text{Quantifast})
 \end{aligned}$$

A Tabela 20 apresenta o modelo de regressão linear múltiplo para os dados de *Ct*.

Tabela 20: Modelo de regressão linear múltiplo para os dados de *Ct*

Preditor	Categorias	Estimativa	I.C 95%	P-valor
Intercepto	-	35,67	(35,24; 36,09)	<0,001
Método	MagMax™ CORE	-1,53	(-1,79; -1,27)	<0,001
	TRIZOL®	REF		
Dia	Dia 2	0,47	(0,15; 0,78)	<0,004
	Dia 3	1,98	(1,66; 2,30)	<0,001
	Dia 1	REF		
Parcela Experimental	1 log>LD II	0,34	(-0,14; 0,83)	0,163
	1 log>LD III	0,87	(0,38; 1,35)	<0,001
	½ log>LD I	1,71	(1,22; 2,19)	<0,001
	½ log>LD II	1,52	(1,04; 2,00)	<0,001
	½ log>LD III	2,20	(1,72; 2,69)	<0,001
	LD	3,60	(3,12; 4,09)	<0,001
Kit RT-qPCR	1 log>LD I	REF		
	QuantiFast	-3,53	(-3,79; -3,27)	<0,001
	GoTaq®	REF		

REF = grupo de referência; LD = limite de detecção ( $10^{1,73}$  TCID<sub>50</sub>/50µL); 1 log>LD = concentração 1 log acima do LD ( $10^{2,73}$  TCID<sub>50</sub>/50µL); ½ log>LD = concentração ½ log acima do LD ( $10^{2,23}$  TCID<sub>50</sub>/50µL).

Para a média geral de *Ct* sem considerar os demais preditores (variáveis), tem-se o valor de 35,67 unidades. Para o preditor *método*, foi observada uma redução média de 1,53 unidades de *Ct* no método de inativação por MagMax™ CORE *Lysis Solution* comparativamente à inativação por TRIZOL®. Para *dia*, foi observado em média um aumento de 0,47 unidades de *Ct* no dia 2 comparativamente ao dia 1, e de 1,98 unidades de *Ct* no dia 3 comparativamente ao dia 1. Tais variações eram esperadas tendo em vista que cada dia de análise reflete as fontes de variabilidade dos processos de preparo, inativação, extração e aplicação em RT-qPCR.

Para as parcelas experimentais, a categoria de referência adotada pelo modelo foi 1 log>LD I. Em relação à mesma, era esperada ausência de diferença significativa comparativamente às parcelas experimentais de igual concentração (ou seja, 1 log>LD II e 1 log>LD III) e presença de diferença significativa comparativamente às demais concentrações (LD e ½ log>LD).

Entretanto, apenas para a parcela 1 log>LD II, o p-valor se mostrou maior que o nível de significância de 5% (p-valor = 0,163), indicando que em média,

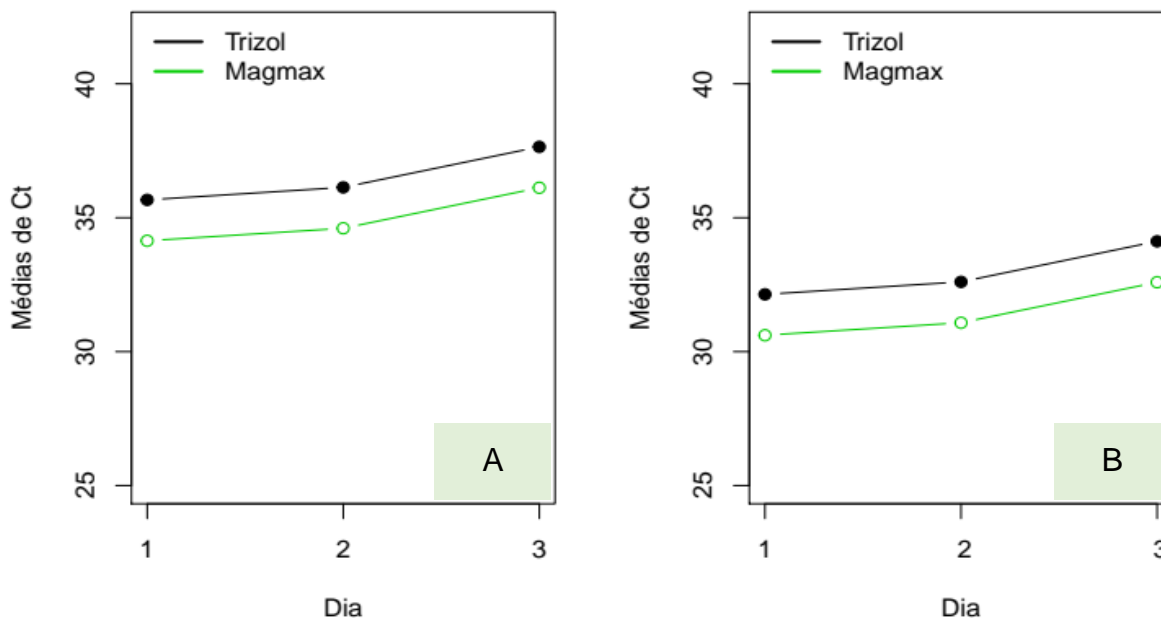
não houve diferença em relação a parcela de referência. Já para a parcela 1 log>LD III, foi indicada diferença significativa, contudo, esta foi relativamente baixa (igual a 0,87 Ct).

Para as demais parcelas, o p-valor indicou diferença significativa. As parcelas experimentais  $\frac{1}{2}$  log>LD I,  $\frac{1}{2}$  log>LD II e  $\frac{1}{2}$  log>LD III, apresentaram em média, aumento respectivo de 1,71, 1,52, e 2,20 unidades de Ct em relação à referência 1 log>LD I. Foi portanto, demonstrada uma capacidade resolutive da técnica, capaz de distinguir Ct de amostras que diferem em  $\frac{1}{2}$  log. O LD por sua vez, apresentou em média, aumento de 3,60 unidades de Ct em relação à categoria de referência.

Por fim, para a variável kit de RT-qPCR, o *Mix QuantiFast Probe RT-PCR* (Qiagen, Alemanha) apresentou uma redução média de 3,53 unidades de Ct em comparação com o *GoTaq® Probe 1- Step RT-qPCR System* (Promega, EUA).

Aplicando-se o modelo de regressão linear múltiplo desenvolvido, foi realizada análise desconsiderando os efeitos das variáveis de forma simultânea, ou seja, considerando os efeitos individuais de cada preditor. Os gráficos da Figura 40 apresentam dois casos em particular: a análise (método + dia) e a análise (método + dia + kit de RT-qPCR). Dessa maneira, foi possível estudar quais os efeitos produziram maior e menor valores de Ct.

**Figura 40: Médias estimadas de Ct para inativação por TRIzol® e por MagMax™ CORE Lysis Solution em três dias utilizando dois kits de RT-qPCR (A) GoTaq® (Promega, EUA) e (B) QuantiFast (QIAGEN, Alemanha)**



Fonte: Da autora.

As médias estimadas pelo modelo de regressão múltiplo para os métodos de inativação viral testados, nos três dias de estudo com os kits *GoTaq*® (Promega) e *QuantiFast* (QIAGEN) indicaram maior sensibilidade pelo kit *QuantiFast*, seja qual tenha sido o método de inativação das amostras; e uma maior sensibilidade geral para amostras inativadas por *MagMax*™ CORE *Lysis Solution*, destacando-se que mesmo quando o kit de RT-qPCR que apresentou menor desempenho foi empregado, as amostras tratadas por *MagMax*™ CORE *Lysis Solution* ainda responderam com desempenho superior àquelas tratadas por *TRIzol*®.

## 6 Conclusões e Considerações finais

Este trabalho comprovou a eficácia do tampão de lise MagMAX™ CORE em conjunto com proteinase K para inativação do vírus da Febre Aftosa em líquido esofágico faríngeo bovino nas condições de coleta de campo, ou seja, aliquotado para igual proporção de Meio Earle, e contaminado experimentalmente com FMDV O RS BR/80. Resultados de isolamento viral em cultura de tecido, em três passagens cegas indicaram a ausência de partículas virais infecciosas nas diluições correspondentes a  $10^{0,01}$  a  $10^{-1,99}$  TCID<sub>50</sub>/50 µL após tratamento pela solução de lise MagMax™ CORE.

A verificação de desempenho do método diagnóstico de Febre Aftosa por RT-qPCR sob as condições de inativação estabelecidas através da adaptação do protocolo para inativação de amostras virais *MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)*, demonstrou que o uso de *MagMax™ CORE Lysis Solution* pode ser implementado no diagnóstico molecular para FMD adotado atualmente no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais para amostras de LEF bovino, em alternativa à metodologia que utiliza TRizol® como inativante, tendo inclusive, apresentado desempenho superior a esta, no tocante à sensibilidade, tempo de análise e menor exposição do analista a substâncias tóxicas. Os parâmetros estabelecidos para o método que utiliza *MagMax™ CORE Lysis Solution* como inativante viral corresponderam a Limite de Detecção de  $10^{1,7}$  TCID<sub>50</sub>/50µL, eficiência da RT-qPCR de 98,0% (avaliada com amostra submetida à etapas anteriores de inativação viral e extração de ácidos nucléicos), variâncias de repetibilidade, reprodutibilidade intralaboratorial e erro de medida do método respectivamente de 7,33, 9,99 e 17,32% e incerteza expandida de 0,64 Ct. Os parâmetros estabelecidos para o método que utiliza TRizol® como inativante viral corresponderam a Limite de Detecção de  $10^{1,7}$  TCID<sub>50</sub>/50µL, eficiência da RT-qPCR de 94,4% (avaliada com amostra submetida à etapas anteriores de inativação viral e extração de ácidos nucléicos), variâncias de repetibilidade, reprodutibilidade intralaboratorial e erro de medida do método respectivamente de 10,76, 16,49 e 27,26% e incerteza expandida de 0,94 Ct.

O Relatório de Validação da técnica de RT-qPCR para detecção do vírus da Febre Aftosa documentado no LFDA-MG quando da sua implementação no

ano de 2012 (catalogação interna sob o código FOR/LBM/PL/023) relata incerteza do método  $U = 0,64$  para LEF em Meio Earle com inativação por TRIzol® e extração manual de RNA pelo protocolo de extração por TRIzol®. A incerteza calculada no presente trabalho para a mesma matriz biológica LEF em veículo Earle sob condições de inativação por TRIzol® e MagMAX™ CORE Lysis Solution e extração de ácidos nucleicos automatizada, por sua vez, consistiu em 0,94 e 0,64 respectivamente. A diferença 0,3Ct entre a incerteza obtida no ano de 2012 para 2020 para tratamento por TRIzol® pode residir na variação de equipamento termociclador utilizado, na técnica de extração de RNA utilizada, ou ainda na carga viral da suspensão viral inicial para contaminação das amostras, a qual não foi possível resgatar através da documentação mantida no LFDA-MG relativa ao ano de 2012. Ainda em relação à verificação anteriormente realizada, os protocolos seguidos no presente trabalho diferiram também quanto ao kit de RT-qPCR e o termociclador. Estes fatores podem gerar contribuições diferentes para os parâmetros testados. Portanto, a relação que se estabelece aqui não é uma comparação direta entre a metodologia diagnóstica previamente avaliada no LFDA-MG com a relatada neste trabalho, mas sim uma demonstração de que mesmo frente às variáveis as quais o Laboratório está sujeito enquanto órgão da União, que segue a modalidade de Licitação para aquisição de bens e materiais, o método de diagnóstico molecular é capaz de responder com satisfatória robustez. Isso foi indicado também pelo Ct médio do Limite de Detecção de 37,38 quando da implementação da técnica, contra um Ct médio de 38,20 para inativação por TRIzol® e de 34,53 para inativação por MagMAX™ CORE Lysis Solution (dados da tabela 17), muito embora deva-se ter cautela na comparação de tais valores porque não foi possível resgatar o título da amostra viral de partida no estudo de implementação da técnica no LFDA-MG.

As vantagens do uso do tampão de lise MagMAX™ CORE relativamente ao TRIzol® são: (i) menor tempo demandado para a extração de ácidos nucleicos, consistindo na transferência direta da amostra inativada para o cartucho de extração Maxwell® 16 LEV, contra diversas etapas anteriores à adição ao cartucho no caso da inativação por TRIzol® (adição de clorofórmio, homogenização, incubação a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugação por 15 minutos); (ii) menor custo por amostra (R\$4,84 contra R\$7,48, considerando os custos atuais de 50 mL de MagMAX™ CORE Lysis

*Solution Catalog Number A32837* igual a R\$407,86 e 5 mL de proteinase K, *Catalog Number EO0491 (>600 U/mL)* igual a R\$997,02, contra 200 mL de TRIZOL® *Catalog Number 15596018* com custo atual de R\$1496,40); além de (iii) representar menor desconforto e insalubridade ao analista durante sua manipulação. O TRIZOL® apresenta os seguintes perigos para a saúde de acordo com sua Ficha de Dados de Segurança, fornecida pelo fabricante: toxicidade aguda por via oral, cutânea e inalatória, corrosão e irritação cutânea, lesões oculares graves/irritação ocular, mutagenicidade em células germinativas, toxicidade para órgãos-alvo específicos por exposição única e repetida, além de apresentar toxicidade crônica para o ambiente aquático (TRIZOL REAGENT: Ficha de Dados de Segurança, 2017), contra o tampão de lise MagMax™ CORE, caracterizado em sua Ficha de Dados de Segurança (com base nos critérios de classificação Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 14725-2:2014) como apresentando toxicidade aguda, corrosão/irritação cutânea, irritação/danos graves aos olhos, toxicidade sistêmica em órgão-alvo específico para exposição única, toxicidade aquática aguda, e toxicidade crônica para o ambiente aquático (MagMAX™ CORE Lysis Solution: FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA, 2019), onde pode-se notar que, embora ambos os reagentes apresentem determinado grau de perigo, a já mencionada volatilidade do TRIZOL® e a presença de fenol em sua composição o coloca em certo grau de desvantagem, inclusive requerendo segregação, descarte e tratamento diferenciado dos demais resíduos gerados no laboratório de análise.

Concluiu-se que os resultados obtidos contribuíram de maneira importante para um melhor conhecimento da resposta da metodologia de diagnóstico molecular da Febre Aftosa em vigência no LFDA-MG, e apontaram o MagMAX™ CORE *Lysis Solution* como uma alternativa segura ao método de inativação viral adotado, que, de acordo com os dados apresentados, apresentou-se superior em desempenho ao método atualmente preconizado pela OIE, além de representar uma economia real para o erário público, e, a oferta de um método alternativo no caso de restrição mercadológica de quaisquer natureza relativa ao método atual. Apontou também para um melhor desempenho do método de amplificação QuantiFast, independente do inativador usado, porém, sendo ainda superior quando do uso de amostras inativadas pelo MagMAX™ CORE *Lysis Solution*. Os resultados desta dissertação abriram ainda um novo campo de

direcionamento de futuros testes para um estudo mais abrangente da matriz biológica Líquido Esofágico Faríngeo, tendo em vista que estudos importantes apontam a consistência desta amostra biológica para a vigilância sanitária da Febre Aftosa no tocante aos animais persistentemente infectados.



## 7 Referências bibliográficas

ACHARYA, R.; FRY, E.; STUART, D.; FOX, G.; ROWLANDS, D.; BROWN, F. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. **Nature**, England, v. 337, n. 6209, p. 709–716, 1989. DOI: 10.1038/337709a0.

ALEXANDERSEN, S.; QUAN, M.; MURPHY, C.; KNIGHT, J.; ZHANG, Z. Studies of quantitative parameters of virus excretion and transmission in pigs and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 129, n. 4, p. 268–282, 2003. DOI: 10.1016/S0021-9975(03)00045-8.

BARANOWSKI, Eric; SEVILLA, Noemi; VERDAGUER, Nuria; RUIZ-JARABO, Carmen M.; BECK, Ewald; DOMINGO, Esteban. Multiple Virulence Determinants of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cell Culture. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 72, n. 8, p. 6362–6372, 1998. DOI: 10.1128/jvi.72.8.6362-6372.1998.

BLOW, Jamie A.; DOHM, David J.; NEGLEY, Diane L.; MORES, Christopher N. Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 119, n. 2, p. 195–198, 2004. DOI: 10.1016/j.jviromet.2004.03.015.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 495–503, 1990. DOI: 10.1128/JCM.28.3.495-503.1990.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano de Ação para Febre Aftosa: Atendimento à Notificação de Suspeita de Doença Vesicular**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Coletânea de imagens: lesões de febre aftosa e de outras doenças incluídas no sistema nacional de vigilância de doenças vesiculares**. Brasília: MAPA/SDA/DSA, 2009. b. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50227>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E

ABASTECIMENTO. **Manual de verificação de desempenho de métodos para diagnóstico molecular de doenças infecciosas na rede nacional de laboratórios agropecuários.** Brasília: MAPA/ACS, 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Projeções do agronegócio – Brasil 2016/17 a 2026/27: projeções de longo prazo.** Brasília: MAPA/SPA, 2017. a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa nacional de erradicação e prevenção da febre aftosa - Plano Estratégico – 2017–2026.** 1. ed. Brasília: MAPA, 2017. b. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/vacinacao/PNEFA\\_Plano\\_Estratgico\\_2017\\_2026verso2017pt.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/vacinacao/PNEFA_Plano_Estratgico_2017_2026verso2017pt.pdf).

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Orientações para fiscalização do comércio de vacinas contra a Febre Aftosa e para controle e avaliação das etapas de vacinação.** 2. ed. Brasília: MAPA/SDA, 2019. a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Programa nacional de erradicação e prevenção da febre aftosa - Plano Estratégico – 2017–2026: atualização 2019.** Brasília: MAPA, 2019. b. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/vacinacao/Plano\\_estrategico\\_versao\\_2019pt.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/vacinacao/Plano_estrategico_versao_2019pt.pdf).

BRAZIL. MINISTRY OF AGRICULTURE LIVESTOCK AND FOOD SUPPLY. **Eradication of a FMD outbreak in Mato Grosso do Sul, Brazil.** Brasília: Secretariat of Animal and Plant Health and Inspection, 2008. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/arquivos/RelatrioMTENG.pdf>.

BRITO, B. P.; RODRIGUEZ, L. L.; HAMMOND, J. M.; PINTO, J.; PEREZ, A. M. Review of the Global Distribution of Foot-and-Mouth Disease Virus from 2007 to 2014. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 316–332, 2017. DOI: 10.1111/tbed.12373. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12373>. Acesso em: 20 jul. 2020.

BROWN, C. C.; PICCONE, M. E.; MASON, P. W.; MCKENNA, T. S.;

GRUBMAN, M. J. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. **Journal of virology**, [S. l.], v. 70, n. 8, p. 5638–5641, 1996. DOI: 10.1128/JVI.70.8.5638-5641.1996.

BURNS, M.; VALDIVIA, H. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. **European food research and technology = Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. A**, [S. l.], v. 226, n. 6, p. 1513–1524, 2008. DOI: 10.1007/s00217-007-0683-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0683-z>.

BUSTIN, Stephen A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, England, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

CALLAHAN, Johnny D. et al. Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 220, n. 11, p. 1636–1642, 2002. DOI: 10.2460/javma.2002.220.1636.

CARRILLO, C.; TULMAN, E. R.; DELHON, G.; LU, Z.; CARRENO, A.; VAGNOZZI, A.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. Comparative Genomics of Foot-and-Mouth Disease Virus. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 79, n. 10, p. 6487–6504, 2005. DOI: 10.1128/jvi.79.10.6487-6504.2005. Disponível em: [/pmc/articles/PMC1091679/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1611679/). Acesso em: 20 jul. 2020.

CARRILLO, Consuelo. Foot and Mouth Disease Virus Genome. In: GARCIA, Maria (org.). **Viral Genomes: Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions**. Londres: InTechOpen, 2012. p. 53–68.

CHANG, Huiyun; MA, Yanbin; LIN, Tong; CONG, Guozheng; DU, Junzheng; MA, Jinling. Foot-and-mouth disease virus carrier status in *Bos grunniens* yaks. **Virology Journal**, [S. l.], v. 10, p. 1–5, 2013. DOI: 10.1186/1743-422X-10-81.

COMISIÓN SUDAMERICANA PARA LA LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA. Informe Final COSALFA 44. In: 44ª REUNIÓN ORDINARIA DE LA COMISIÓN SUDAMERICANA PARA LA LUCHA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA 2017, Rio de Janeiro, RJ. **Anais [...]**. Rio de Janeiro, RJ: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 2017. p. 102.

CONDY, J. B.; HEDGER, R. S.; HAMBLIN, C.; BARNETT, I. T. The duration of the foot-and-mouth disease virus carrier state in African buffalo (i) in the individual animal and (ii) in a free-living herd. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, England, v. 8, n. 3–4, p. 259–265, 1985. DOI: 10.1016/0147-9571(85)90004-9.

CROWTHER, J. R.; UNGER, H.; VILJOEN, G. J. Aspects of kit validation for tests used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: Producer and end-user responsibilities. **OIE Revue Scientifique et Technique**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 913–935, 2006. DOI: 10.20506/rst.25.3.1706.

FRY, E. E.; STUART, D. I.; ROWLANDS, D. J. The structure of foot-and-mouth disease virus. **Current topics in microbiology and immunology**, Germany, v. 288, p. 71–101, 2005. DOI: 10.1007/3-540-27109-0\_4.

GAMARNIK, A. V. .. ANDINO R. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. **RNA**, [S. l.], v. 3, p. 882–892, 1993.

GAO, Yuan; SUN, Shi-Qi; GUO, Hui-Chen. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. **Virology Journal**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 107, 2016. DOI: 10.1186/s12985-016-0561-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0561-z>.

GOMES, I; RAMALHO A.K.; AUGÉ DE MELLO, P. Infectivity assays of foot-and-mouth disease virus: contact transmission between cattle and buffalo (*Bubalus bubalis*) in the early stages of infection. Rio de Janeiro, **The Veterinary Record**, v. 140, p. 43-47, 1997.

GRUBMAN, Marvin J.; BAXT, Barry. Foot-and-Mouth Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 465–493, 2004. DOI: 10.1128/CMR.17.2.465-493.2004.

GUESCINI, Michele; SISTI, Davide; ROCCHI, Marco B. L.; STOCCHI, Laura; STOCCHI, Vilberto. A new real-time PCR method to overcome significant quantitative inaccuracy due to slight amplification inhibition. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 326, 2008. DOI: 10.1186/1471-2105-9-326. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-326>.

**GUIDE to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**. [s.l.] : Applied Biosystems, 2004.

GULLETT, Jonathan C.; NOLTE, Frederick S. Quantitative Nucleic Acid

Amplification Methods for Viral Infections. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 72–78, 2015. DOI: 10.1373/clinchem.2014.223289. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.223289>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Tabela 1846 – Valores a preços correntes**. 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1846#/n1/all/v/all/p/-1/c11255/90687,90691,90696,90705,90706,90707,93404,93405,93406,93407,93408,102880/l/v,,c11255+t+p/resultado>. Acesso em: 14 jul. 2020.

**INVITROGEN: TRizol™ Reagent (DNA isolation) User Guide**. [s.l.] : ThermoFisher Scientific, 2016. Disponível em: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf).

JAMAL, Syed M.; BELSHAM, Graham J. Foot-and-mouth disease: past, present and future. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 116, 2013. DOI: 10.1186/1297-9716-44-116. Disponível em: <http://www.veterinaryresearch.org/content/44/1/116>.

KNOWLES, N. J.; WADSWORTH, J.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; KING, D. P. VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, France, v. 35, n. 3, p. 741–755, 2016. DOI: 10.20506/rst.35.3.2565.

KOCHEL, Tadeusz J.; KOCHER, Gregory A.; KSIAZEK, Thomas G.; BURANS, James P. Evaluation of TRizol LS Inactivation of Viruses. **Applied Biosafety**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 52–55, 2017. DOI: 10.1177/1535676017713739.

KRALIK, Petr; RICCHI, Matteo. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, p. 9, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00108. Disponível em: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org).

LONGJAM, Neeta; DEB, Rajib; SARMAH, A. K.; TAYO, Tilling; AWACHAT, V. B.; SAXENA, V. K. A brief review on diagnosis of foot-and-mouth disease of livestock: Conventional to molecular tools. **Veterinary Medicine International**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI: 10.4061/2011/905768.

MADHANMOHAN, M.; NAGENDRAKUMAR, S. B.; KUMAR, R.; ANILKUMAR, J.; MANIKUMAR, K.; YUVARAJ, S.; SRINIVASAN, V. A. Clinical protection, sub-clinical infection and persistence following vaccination with extinction payloads of O1 Manisa foot-and-mouth disease monovalent vaccine

and challenge in goats and comparison with sheep. **Research in Veterinary Science**, [S. l.], v. 93, n. 2, p. 1050–1059, 2012. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.10.006.

**MagMAX™ CORE Lysis Solution: FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA**. [s.l.] : ThermoFisher Scientific, 2019. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A32837#/A32837>.

MAHMUD, Mohammad Showkat; ISLAM, Eusha; GIASUDDIN, Md; SAMAD, Mohammed; KARIM, Md; ALI, Md. Biological Assay of Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) Serotypes for Titrating BLRI Developed Trivalent FMD Vaccines Seed. **Immunology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 6, 2018. DOI: 10.13189/iid.2018.060201.

MALIRAT, Viviana; BERGMANN, Ingrid. **Manual: RT-PCR y secuenciamento cíclico para estudios de epidemiología molecular del virus de la Fiebre Aftosa**. Rio de Janeiro, RJ: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, 2003. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51673>.

MALIRAT, Viviana; DE MELLO, Paulo Augé; TIRABOSCHI, Beatriz; BECK, Ewald; GOMES, Ivo; BERGMANN, Ingrid E. Genetic variation of foot-and-mouth disease virus during persistent infection in cattle. **Virus Research**, [S. l.], v. 34, n. 1, p. 31–48, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(94\)90117-1](https://doi.org/10.1016/0168-1702(94)90117-1). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168170294901171>.

**MAXWELL® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit**. [s.l.] : Promega,[s.d.].

MIELKE, Sarah R.; GARABED, Rebecca. Environmental persistence of foot-and-mouth disease virus applied to endemic regions. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 543–554, 2020. DOI: 10.1111/tbed.13383.

MONIWA, Mariko; CLAVIJO, Alfonso; LI, Mingyi; COLLIGNON, Brad; PAUL KITCHING, R. Performance of a foot-and-mouth disease virus reverse transcription- polymerase chain reaction with amplification controls between three real-time instruments. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 9–20, 2007. DOI: 10.1177/104063870701900103.

MOONEN, P.; SCHRIJVER, R. Carriers of foot-and-mouth disease virus: A review. **Veterinary Quarterly**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 193–197, 2000. DOI:

10.1080/01652176.2000.9695056.

NARANJO, José. **Análisis de la situación epidemiológica relativa a la detección de virus de fiebre aftosa tipo O en Brasil 2005 (Mato Grosso do Sul, MS) y Argentina 2006 (Corrientes)**. Rio de Janeiro: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2006.

NARANJO, José; COSIVI, Ottorino. Elimination of foot-and-mouth disease in South America: Lessons and challenges. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 368, n. 1623, 2013. DOI: 10.1098/rstb.2012.0381.

NGO, Kiet A.; JONES, Susan A.; CHURCH, Theresa M.; FUSCHINO, Meghan E.; ST. GEORGE, Kirsten; LAMSON, Daryl M.; MAFFEI, Joseph; KRAMER, Laura D.; CIOTA, Alexander T. Unreliable inactivation of viruses by commonly used lysis buffers. **Applied Biosafety**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 56–59, 2017. DOI: 10.1177/1535676017703383. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1535676017703383>.

NUTZ, Sabine; DÖLL, Katharina; KARLOVSKY, Petr. Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. **Analytical and bioanalytical chemistry**, [S. l.], v. 401, n. 2, p. 717–726, 2011. DOI: 10.1007/s00216-011-5089-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21603916>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Manual de procedimentos para a atenção às ocorrências de febre aftosa e outras enfermidades vesiculares: Projeto BID/ PANAFTOSA - OPAS/OMS para os países do MERCOSUL ampliado**. Rio de Janeiro, RJ: PANAFTOSA - OPAS/OMS, 2007. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50426>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico**. 1. ed. Rio de Janeiro: Panaftosa-OPAS, OMS, 2010. Disponível em: <http://bvs1.panaftosa.org.br/local/file/textoc/SerManTec13.pdf>.

PINHEIRO-DE-OLIVEIRA, Tatiana F.; FONSECA, Antonio A.; CAMARGOS, Marcelo F.; LAGUARDIA-NASCIMENTO, Mateus; DE OLIVEIRA, Anapolino M.; COTTORRELLLO, Ana C. P.; GOES-NETO, Aristoteles; BARBOSA-STANCIOLI, Edel F. Development of a droplet digital RT-PCR for the

quantification of foot-and-mouth virus RNA. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 259, p. 129–134, 2018. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.06.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29958921/>. Acesso em: 20 jul. 2020.

POHL, Gudrun; SHIH, Le Ming. Principle and applications of digital PCR. *In: EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS 2004*, **Anais [...]**. : Taylor & Francis, 2004. p. 41–47. DOI: 10.1586/14737159.4.1.41. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14737159.4.1.41>. Acesso em: 20 jul. 2020.

RACANIELLO, V. R. Picornaviridae: the viruses and their replication. *In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (org.). Fields Virology*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 453–489.

**REAL-TIME PCR: Applications Guide**. [s.l.] : Bio-Rad Laboratories, Inc.,[s.d.]. Disponível em: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5279.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf).

**REAL-TIME PCR handbook**. [s.l.] : Life Technologies, 2012.

REID, S. M.; FERRIS, N. P.; HUTCHINGS, G. H.; ZHANG, Z.; BELSHAM, G. J.; ALEXANDERSEN, S. Diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 149, n. 20, p. 621 LP – 623, 2001. DOI: 10.1136/vr.149.20.621. Disponível em: <http://veterinaryrecord.bmj.com/content/149/20/621.abstract>.

REID, Scott M.; FERRIS, Nigel P.; HUTCHINGS, Geoffrey H.; SAMUEL, Alan R.; KNOWLES, Nick J. Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 89, n. 1, p. 167–176, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00213-5). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093400002135>.

REID, Scott M.; FERRIS, Nigel P.; HUTCHINGS, Geoffrey H.; ZHANG, Zhidong; BELSHAM, Graham J.; ALEXANDERSEN, Soren. Detection of all seven serotypes of foot-and-mouth disease virus by real-time, fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 105, n. 1, p. 67–80, 2002. DOI: 10.1016/S0166-0934(02)00081-2.

ROSS, Lisa; VAVRO, Cindy L.; KEHNE, Stacey L.; MCCLERNON, Daniel R.; ST. CLAIR, Marty. Substitution of a commercially available, RNA extraction procedure in an HIV-1 genotyping system improves sensitivity and allows



reduced sample volume. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 1–4, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00275-5](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00275-5). Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093400002755>.

SABATINI, Paul V.; KRENTZ, Nicole A. J.; ZARROUKI, Bader; WESTWELL-ROPER, Clara Y.; NIAN, Cuilan; UY, Ryan A.; SHAPIRO, A. M. James; POITOUT, Vincent; LYNN, Francis C. Npas4 Is a Novel Activity–Regulated Cytoprotective Factor in Pancreatic  $\beta$ -Cells. **Diabetes**, [S. l.], v. 62, n. 8, p. 2808 LP – 2820, 2013. DOI: 10.2337/db12-1527. Disponível em: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/62/8/2808.abstract>.

SAKUDO, Akikazu; ONODERA, Takashi; TANAKA, Yasuharu. Inactivation of Viruses. In: SAKUDO, Akikazu; SHINTANI, Hideharu (org.). **Sterilization and Disinfection by Plasma: Sterilization Mechanisms, Biological and Medical Applications**. [s.l.] : Nova Science Publishers, Inc., 2010.

SALT, J. S. The carrier state in foot and mouth disease-an immunological review. **British Veterinary Journal**, [S. l.], v. 149, n. 3, p. 207–223, 1993. DOI: 10.1016/S0007-1935(05)80168-X.

**SCHEMATIC map of the FMDV genome**. 1969. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/17/2/465/F2>. Acesso em: 1 jul. 2020.

SHAHIDUZZAMAN, ANM; HAQUE, ME; RAHMAN, MH; KHAN, MFR; RAHMAN, MB. Serotyping and Adaptation of Foot and Mouth Disease Virus in BHK-21 Cell Line towards the Development of Vaccine Candidate. **International Journal of Vaccines & Vaccination**, [S. l.], v. 3, n. 2, 2016. DOI: 10.15406/ijvv.2016.03.00060. Disponível em: <https://medcraveonline.com/IJVV/serotyping-and-adaptation-of-foot-and-mouth-disease-virus-in-bhk-21-cell-line-towards-the-development-of-vaccine-candidate.html>.

SIDSTEDT, Maja; HEDMAN, Johannes; ROMSOS, Erica L.; WAITARA, Leticia; WADSÖ, Lars; STEFFEN, Carolyn R.; VALLONE, Peter M.; RÅDSTRÖM, Peter. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 410, n. 10, p. 2569–2583, 2018. DOI: 10.1007/s00216-018-0931-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0931-z>.

SIEGL, Günter; WEITZ, Manfred; KRONAUER, Gertrud. Stability of Hepatitis A Virus. **Intervirology**, [S. l.], v. 22, p. 218–226, 1984.

SILVA, Thalita G. R.; MIRANDA, Sílvia H. G. **A Febre Aftosa e os impactos econômicos no setor de carnes**. 2006. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/documentos/texto/a-febre-aftosa-e-os-impactos-economicos-no-setor-de-carnes.aspx>. Acesso em: 14 set. 2020.

SMITHER, Sophie J.; WELLER, Simon A.; PHELPS, Amanda; EASTAUGH, Lin; NGUGI, Sarah; O'BRIEN, Lyn M.; STEWARD, Jackie; LONSDALE, Steve G.; LEVER, Mark S. Buffer AVL alone does not inactivate ebola virus in a representative clinical sample type. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 53, n. 10, p. 3148–3154, 2015. DOI: 10.1128/JCM.01449-15.

SPICKLER, Anna Rovid. **Foot-and-mouth disease**. [s.l.] : Iowa State University / The Center for Food Security and Public Health, 2015.

STENFELDT, C.; PACHECO, J. M.; SMOLIGA, G. R.; BISHOP, E.; PAUSZEK, S. J.; HARTWIG, E. J.; RODRIGUEZ, L. L.; ARZT, J. Detection of Foot-and-mouth Disease Virus RNA and Capsid Protein in Lymphoid Tissues of Convalescent Pigs Does Not Indicate Existence of a Carrier State. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 63, n. 2, p. 152–164, 2016. DOI: 10.1111/tbed.12235. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12235>. Acesso em: 20 jul. 2020.

STENFELDT, Carolina; HARTWIG, Ethan J.; SMOLIGA, George R.; PALINSKI, Rachel; SILVA, Ediane B.; BERTRAM, Miranda R.; FISH, Ian H.; PAUSZEK, Steven J.; ARZT, Jonathan. Contact Challenge of Cattle with Foot-and-Mouth Disease Virus Validates the Role of the Nasopharyngeal Epithelium as the Site of Primary and Persistent Infection. **mSphere**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 1–18, 2018. DOI: 10.1128/msphere.00493-18.

STENFELDT, Carolina; LOHSE, Louise; BELSHAM, Graham J. The comparative utility of oral swabs and probang samples for detection of foot-and-mouth disease virus infection in cattle and pigs. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 162, n. 2–4, p. 330–337, 2013. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.09.008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.09.008>.

SVEC, David; TICHOPAD, Ales; NOVOSADOVA, Vendula; PFAFFL, Michael W.; KUBISTA, Mikael. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, [S. l.], v. 3, p. 9–16, 2015. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214753515000169>.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (SIB). **Aphthovirus**. 2008. Disponível em: [https://viralzone.expasy.org/98?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/98?outline=all_by_species). Acesso em: 14 jul. 2020.

**TRIZOL REAGENT: Ficha de Dados de Segurança**. [s.l.] : Life Technologies, 2017. Disponível em: [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com).

UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE. **Foot-and-mouth Disease: Sources of Outbreaks and Hazard Categorization of Modes of Virus Transmission**. Fort Collins, US: USDA/ APHIS, 1994. Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/eufmd/USDA\\_\\_1994.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/eufmd/USDA__1994.pdf).

UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Latest forecast on file: Meat, Beef and Veal % World Production**. 2020a. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/topCountriesByCommodity>. Acesso em: 2 out. 2020.

UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Latest forecast on file: Meat, Beef and Veal % World Exports**. 2020b. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/topCountriesByCommodity>. Acesso em: 2 out. 2020.

UNITED STATES. DEPARTMENT OF AGRICULTURE; FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Livestock and poultry: World Markets and Trade**. [s.l.] : USDA/FAS; Office of Global Analysis, 2020. c. Disponível em: <https://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>.

VINNER, Lasse; FOMSGAARD, Anders. Inactivation of orthopoxvirus for diagnostic PCR analysis. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 146, n. 1–2, p. 401–404, 2007. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.07.025.

VOLKIN, David B.; BURKE, Carl J.; MARFIA, Kimberly E.; OSWALD, C. Brent; WOLANSKI, Bohdan; MIDDAUGH, C. Russell. Size and conformational stability of the hepatitis A virus used to prepare VAQTA, a highly purified inactivated vaccine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 86, n. 6, p. 666–673, 1997. DOI: 10.1021/js960475h.

VON HIPPEL, Peter H.; WONG, Kwok-Ying. Neutral Salts: The Generality of Their Effects on the Stability of Macromolecular Conformations. **Science**, [S. l.], v. 145, n. 3632, p. 577 LP – 580, 1964. DOI: 10.1126/science.145.3632.577. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/145/3632/577.abstract>.

WANG, Guangxiang; WANG, Yanhua; SHANG, Youjun; ZHANG, Zhidong; LIU, Xiangtao. How foot-and-mouth disease virus receptor mediates foot-and-mouth disease virus infection. **Virology Journal**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1186/s12985-015-0246-z.

WERNIKE, Kerstin; HOFFMANN, Bernd; BEER, Martin. Single-tube multiplexed molecular detection of endemic porcine viruses in combination with background screening for transboundary diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 51, n. 3, p. 938–944, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02947-12. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3592051/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3592051/?report=abstract). Acesso em: 20 jul. 2020.

WOOD, Britta A. et al. Inactivation of foot-and-mouth disease virus A/IRN/8/2015 with commercially available lysis buffers. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 278, p. 113835, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113835>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093419304021>.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Official disease status: Foot-and-mouth disease (FMD)**. [s.d.]. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/fmd/>. Acesso em: 20 jul. 2020a.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. International Reference Standards for Polymerase Chain Reaction assays. In: **Oie Guidelines for Veterinary Laboratories**. Paris: OIE, [s.d.]. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/Reagents/A\\_GUIDELINE\\_PCR\\_STANDARDS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Reagents/A_GUIDELINE_PCR_STANDARDS.pdf).

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Chapter 2.1.5: Foot-and-mouth disease. In: **OIE Terrestrial Manual 2009**. Paris: OIE, 2009. p. 1–29. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/A\\_FMD2012/docs/2.01.05\\_FMD.pdf](http://www.oie.int/eng/A_FMD2012/docs/2.01.05_FMD.pdf).

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Foot-and-Mouth disease: Technical Disease Card**. 2013. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Di](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Di)

sease\_cards/FOOT\_AND\_MOUTH\_DISEASE.pdf. Acesso em: 17 jul. 2020.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Foot and Mouth Disease, Colombia.** [s.l: s.n.]. Disponível em: [https://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page\\_refer=MapFullEventReport&reportid=28150](https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=28150).

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Chapter 3.1.8: Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). *In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2019.* Paris: OIE, 2019. a. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.08\\_FMD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf).

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Chapter 1.1.2.: Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. *In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals.* [s.l: s.n.]. p. 18.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. Chapter 8.8.: Infection with foot and mouth disease virus. *In: OIE - Terrestrial Animal Health Code.* Paris: OIE, 2019. c. p. 24.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **SOUTH AMERICA: OIE members' official FMD status map.** 2020a. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/js/images/fmd/FMD\\_SouthAmerica\\_ENG.png](https://www.oie.int/fileadmin/Home/js/images/fmd/FMD_SouthAmerica_ENG.png). Acesso em: 14 jul. 2020.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **RESOLUTIONS - Adapted Procedure 2020: Adopted by the World Assembly of OIE Delegates in accordance with the adapted procedure for the adoption of OIE resolutions in the wake of the Covid-19 pandemic.** [s.l: s.n.].

WRIGHT, C. F.; GLOSTER, J.; MAZELET, L.; PATON, D. J.; RYAN, E. D. Short-lived carriage of foot-and-mouth disease virus in human nasal cavities after exposure to infected animals. *Veterinary Record*, [S. l.], v. 167, n. 24, p. 928–931, 2010. DOI: 10.1136/vr.c6275.

YUAN, Hong et al. The pH stability of foot-and-mouth disease virus. *Virology Journal*, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 233, 2017. DOI: 10.1186/s12985-017-0897-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0897-z>.