

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Especialização em Microbiologia

Diagnóstico molecular de BVDV (*Bovine viral diarrhea virus*) baseado na região
5'UTR

Fernanda Silveira Vieira

Belo Horizonte

2011

Diagnóstico molecular de BVDV (*Bovine viral diarrhea virus*) baseado na região
5'UTR

Fernanda Silveira Vieira

Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Microbiologia com ênfase em saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Edel Figueiredo
Barbosa Stancioli

Co-Orientadora: Camila Pacheco Silveira
Martins

Belo Horizonte

2011

Agradecimentos

À minha professora e orientadora Edel pela oportunidade, orientação, amor e paciência durante os 4 anos em que fui sua aluna.

À Cláudia que, pelo pouco tempo que esteve presente em minha vida, me ensinou muito sobre como ser ética, profissional e ao mesmo tempo fazer tudo com amor.

À Camila que foi com toda certeza indispensável para a finalização desta monografia.

À minha querida Fábria, que me acolheu e ajudou desde o primeiro dia que estive no laboratório até o último dia. Sempre bem disposta a ajudar a todos.

Aos meus amigos do Labmic principalmente a Amanda, pela disponibilidade em colaborar sempre.

Aos meus colegas da especialização que sabem o quanto é dispendioso estar presente todos os fins de semana e tornaram para mim um momento feliz e mais leve.

Aos meus pais, Marlene e Márcio pelo amor e incentivo. Sem eles jamais seria possível concluir este curso.

Aos meus amigos/irmos pela amizade gratificante ao longo de anos.

E a todos que de maneira direta ou indireta, mesmo que pequena, sempre me deram uma palavra de incentivo, carinho e amizade, e que com certeza contribuiu para a minha formação.

Resumo

O vírus da Diarreia Viral Bovina (*Bovine viral diarrhea virus* - BVDV) apresenta distribuição cosmopolita. A prevalência da doença está diretamente associada com a presença de animais persistentemente infectados, que são o ponto chave na epidemiologia da doença, além da transmissão via sêmen, fômites e transferência de embriões. O código sanitário para os animais terrestres instituído pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconiza a testagem de agentes virais com circulação no gado bovino, incluindo o BVDV. Embora seja feita a exigência da testagem dos touros utilizados em inseminação artificial ou monta natural, o teste no sêmen ainda não é preconizado e necessita ser desenvolvido para triagem de amostras clínicas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de diagnóstico por PCR, utilizando a região 5'UTR, para a detecção dos vírus BVDV-1 e BVDV-2 em sêmen bovino. Foi realizada a inoculação de isolados virais citopatogênicos (amostras NADL e SV253) e não citopatogênicos (amostra NY-1) em cultura de células MDBK para amplificação e titulação viral. Uma amostra sêmen foi infectada experimentalmente com o vírus para posterior extração do RNA e amplificação por RT-PCR a partir de iniciadores e protocolos específicos. Obteve-se a amplificação do fragmento de tamanho molecular esperado (157pb-BVDV1; 160pb-BVDV-2) para os três vírus testados, assim como, na infecção experimental do sêmen. Estes resultados demonstram que o teste desenvolvido pode ser utilizado para a triagem de sêmen bovino.

Palavras chaves: BVDV-1, BVDV-2, RT-PCR, 5'UTR, sêmen de bovino.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Desenho dos iniciadores e tamanhos dos amplicons.

Tabela 2. Concentração de RNA total utilizado nos ensaios de clonagem.

Tabela 3. Condições padronizadas para PCR de BVDV.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do vírus da Diarréia viral bovina

Figura 2. Mapa estrutural do genoma do vírus da Diarréia viral bovina

Figura 3. Vias de nascimento de animal PI

Figura 4. Possíveis conseqüências da infecção pelo vírus da Diarréia viral bovina sobre a reprodução

Figura 5. Amplificação de amostras de BVDV utilizando iniciadores específicos

Figura 6. PCR das amostras padrão clonadas em vetor PGEMT *easy*

Figura 7. Digestão enzimática dos clones de BVDV-2

Figura 8. Análise da similaridade do clone pGEM-T *easy*/BVDV-2 com diferentes amostras de BVDV-2

Figura 9. Análise da similaridade do clone pGEM-T *easy*/BVDV-2 com diferentes amostras de BVDV-1 (NADL e NY-1)

Figura 10. Sensibilidade analítica da PCR desenvolvida à partir de sêmen contaminado experimentalmente com o vírus BVDV-1 amostra NADL

Figura 11. Sensibilidade analítica da PCR utilizando como molde clone plasmidial do vírus BVDV-1 amostra NADL

Figura 12. Sensibilidade analítica da PCR utilizando como molde clone plasmidial plasmidial do vírus BVDV I amostra NY-1

Figura 13. Sensibilidade analítica da PCR utilizando como molde clone plasmidial do vírus BVDV-2 amostra SV253

Lista de Abreviaturas

Ag - Atograma

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial

BDV - Vírus da doença das fronteiras (*Border disease virus*)

BoHV-1 - Herpesvirus bovino 1 (*Herpesvirus bovino 1*)

BVDV - Vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*)

CCPS - Centro de coleta e processamento de sêmen

CSFV – Vírus da peste suína clássica (*Classical swine fever virus*)

DNA - Ácido desoxirribunucleico

CP - Citopatogênico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

Fg- Fentograma

IFN- Interferon

IT- Imunotolerante

Kb - Kilobases

kDa - Kilodaltons

LDL-R - Receptor de lipoproteínas de baixa densidade

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária, e Abastecimento

mM - Mili molar

NCP - Não citopatogênico

Ng - Nanograma

Nm - Nanômetro

OIE – Organização Mundial da Saúde Animal (*Office des Epizooties*)

ORF - Fase aberta de leitura (*Open reading frame*)

Pb - pares de base

PI - Persistentemente infectado

Pg - Picograma

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNA - Ácido Ribonucleico

RT-PCR - Transcrição reversa seguida de PCR

SFB- Soro Fetal Bovino

Tth - *Thermus thermophilus*

UTR – Região não traduzida (*Untranslated region*)

Sumário

1. Introdução.....	9
2. Justificativa.....	11
3. Referencial Teórico.....	13
3.1. Características biológicas do BVDV.....	13
3.2. Aspectos epidemiológicos.....	16
3.3. Fisiopatologia.....	20
3.4. Diagnóstico.....	24
3.5. Controle, prevenção e tratamento.....	28
4. Objetivos.....	31
5. Metodologia.....	32
6. Resultados e discussão.....	40
7. Conclusão.....	49
Referências Bibliográficas.....	50

1. Introdução

O vírus da Diarréia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus* - BVDV) é um dos principais patógenos relacionado a perdas econômicas significativas para a pecuária bovina em todo o mundo. Está associado a múltiplas manifestações clínicas incluindo doença gastrointestinal, falhas reprodutivas, doença das mucosas (Mucose disease - MD) e indução de infecções persistentes. Animais persistentemente infectados (PI) são os reservatórios do vírus e potenciais disseminadores da infecção. As vias de eliminação do vírus são as excreções e as secreções corporais, como fezes, urina, leite, sêmen, saliva, lágrima, secreções nasais e uterinas, além do sangue e da placenta. A transmissão do BVDV ocorre principalmente pelo contato direto. Fêmeas PI transmitem o vírus para sua descendência. O contato indireto também é importante na transmissão do BVDV, que pode ser realizado por meio de fômites como luvas para palpação retal, agulhas, formigas para contenção, utensílios, comedouros para alimentação e medicamentos contaminados.

Estudos recentes têm demonstrado que a infecção pelo BVDV está amplamente difundida no rebanho bovino do Brasil e que as amostras brasileiras do vírus apresentam variabilidade antigênica marcante. As estratégias de controle do vírus incluem o emprego de vacinação, diagnóstico de animais PI, sua remoção e a avaliação de novos animais a serem introduzidos nos rebanhos.

O BVDV tem sido reconhecido não somente como patógeno veterinário, mas também como contaminante comum de soro fetal bovino, de cultivos celulares e vacinas.

Com base na replicação em cultura de células, este agente apresenta dois biotipos, um citopatogênico (CP) e outro não citopatogênico (NCP). Este último não causa alterações morfológicas visíveis em cultivo celular e, para a sua detecção são necessários testes adicionais.

Vários testes diagnósticos têm sido utilizados para a detecção do vírus. Dentre eles, o isolamento viral, o ELISA e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Dentreos testes moleculares, a PCR constitui-se como uma importante ferramenta de diagnóstico, por apresentar alta sensibilidade e especificidade,

sendo capaz de detectar o agente infeccioso e o diferenciar dos demais. Devido a isso, pode ser aplicada a uma rotina de laboratório para análise de amostras individuais para monitoramento de animais PI ou em animais com infecções primárias agudas, em que a produção de anticorpos ainda não alcançou um limite detectável, tornando-se bastante útil. A PCR tem sido utilizada também, para monitorar estes cultivos e soro fetal bovino (SFB), devido à característica do biotipo NCP do vírus de contaminar cultivos celulares. sem causar danos visíveis à cultura, O genoma viral é constituído de uma fita de RNA simples, polaridade positiva, flanqueado por duas regiões altamente conservadas dentro do gênero *Pestivirus*: as regiões 5'UTR (não traduzida; *untranslated*) e 3'UTR. A região 5'UTR é uma região comumente utilizada para detecção e caracterização do vírus, além de ser útil em análises filogenéticas. Este trabalho teve como objetivo a padronização de um ensaio de PCR utilizando uma região altamente conservada (5'UTR) do genoma dos *Pestivirus* para a detecção de BVDV-1 e BVDV-2 em sêmen de bovino.

2. Justificativa

O vírus da Diarreia viral bovina é um dos principais patógenos de bovinos e causa perdas econômicas significativas para a pecuária bovina mundial. O principal impacto está relacionado a perdas reprodutivas e de produção. No geral a prevalência de anticorpos varia entre 70-80% nos animais testados em todo o mundo. Nos países livres de Febre Aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de numerosos estudos e de programas de controle e erradicação durante décadas.

O BVDV está associado a múltiplas manifestações clínicas incluindo diarreia aguda, doença das mucosas e diarreia crônica. Em fêmeas prenhes a doença aguda leva ao abortamento, mumificação fetal, natimortos, anomalias congênitas e ao nascimento de crias fracas.

A importância do desenvolvimento de testes moleculares rápidos e específicos para o diagnóstico de rotina de agentes virais bovinos é ressaltada pelos números da pecuária nacional: o Brasil atingiu 207 milhões de cabeças em 2005 e a exportação de produtos e subprodutos atingiu a marca de aproximadamente 2.520.000 mil, segundo dados do IBGE.

O sêmen, que tem um alto valor zootécnico, é considerado uma amostra clínica de alta importância pela possibilidade de veicular diversos agentes infecciosos, dentre estes, os vírus. Estudos apontam o sêmen utilizado em inseminação artificial como sendo uma fonte plausível de infecção de BVDV. A Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA) relatou um crescimento de 30% na comercialização do sêmen bovino nos últimos cinco anos, sendo que em 2009 a venda de doses de sêmen, tanto de genética importada quanto nacional, atingiu a marca dos 10 milhões no Brasil. Embora estes números significativos do comércio de sêmen cheguem em torno de 90%, grande parte da reprodução bovina nacional é baseada na monta natural, e, para esta, a avaliação do sêmen tem a mesma importância.

De acordo com a instrução normativa sda nº 48, de 17 de junho de 2003 do Departamento de Saúde Animal, somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA) que cumprirem os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen no país. Um desses requisitos é a avaliação do sêmen para algumas doenças, dentre elas a Diarreia viral bovina. Dentre os testes preconizados para a avaliação de sêmen está o isolamento viral, mas a reação em cadeia da polimerase é indicada pela OIE para a detecção tanto do BVDV quanto do BTV (*Blue tongue virus*) e BoHV-1 (*Bovine Herpesvirus 1*) na avaliação de outras amostras clínicas. Porém, relatos têm demonstrado que o sêmen "*in natura*" apresenta limitação para o isolamento viral devido a suas atividades citotóxicas para culturas. Desta forma, o desenvolvimento e padronização de uma PCR para a detecção do BVDV no sêmen, favorecerá os programas de controle, aumentando a especificidade e sensibilidade de detecção.

3. Referencial Teórico

3.1. Características biológicas do BVDV

Os Pestivírus são um grupo de vírus de importância econômica mundial que infectam bovinos, suínos, ovinos e caprinos, podendo desencadear nestes animais diferentes patologias. O BVDV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, que abriga outros dois vírus antígenicamente relacionados: o vírus da Peste suína clássica (*Classical swine fever virus*, CSFV) e o vírus da Doença das fronteiras, (*Border disease virus*, BDV) (Heinz *et al.*, 2000).

A partícula do BVDV possui 40-60 nm de diâmetro, e contém um nucleocapsídeo esférico de simetria icosaédrica envolto por um envelope lipoprotéico (figura 1). O genoma é composto por uma molécula de RNA linear, fita simples, senso positivo, com aproximadamente 12,5 kilobases (Potgieter *et al.*, 2004)

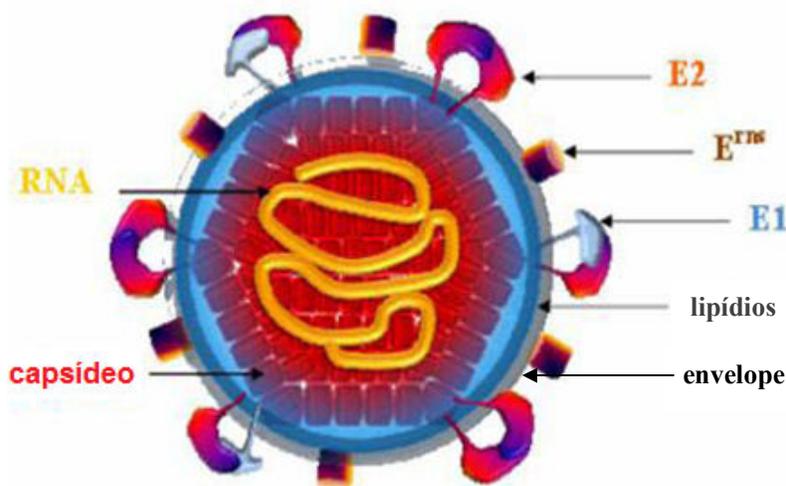


Figura 1. Representação esquemática do vírus da Diarréia viral bovina (Fonte: Noiva, 2010).

Apresenta uma fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma poliproteína de aproximadamente 4000 aminoácidos, flanqueada por duas regiões não traduzidas, 5'UTR e 3'UTR (Potgieter, 2004). A região 5' UTR contém estruturas secundárias necessárias para o início da tradução do genoma viral, sendo altamente conservada. A poliproteína é clivada durante ou após a tradução por proteases celulares ou virais, apresentando a seguinte ordem: N-terminal autoprotease (Npro), proteína do capsídeo (C), proteínas do envelope (Erns, E1 e E2), p7, e proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B) (Figura 2) (Belak, 2007).

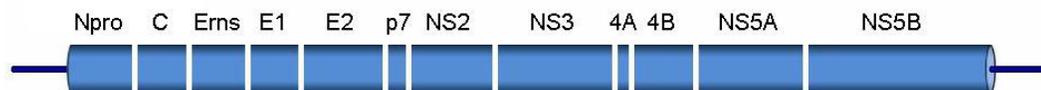


Figura 2. Mapa estrutural do genoma do vírus da Diarreia Bovina Viral (Fonte: Murray et al., 2008).

O primeiro terço da janela aberta de leitura codifica a protease viral Npro e as proteínas estruturais C, Erns, E1, E2. Os dois terços restantes codificam a proteína p7 e as proteínas não-estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B (Goens, 2002; Potgieter, 2004).

As quatro proteínas estruturais C, Erns, E1 e E2 combinam-se com o RNA genômico e com o envelope para formar o vírion. A proteína C, do capsídeo é obtida a partir da poliproteína primária após clivagens enzimáticas induzidas pela Npro. As próximas clivagens serão realizadas no retículo endoplasmático da célula hospedeira por enzimas celulares que irão separar a proteína C da proteína Erns e dar continuidade ao seu processamento. A proteína resultante não apresenta uma estrutura secundária significativa e possui um elevado número de resíduos envolvidos em interações de baixa afinidade com o RNA. Acredita-se que esta ligação de baixa afinidade com o RNA permitirá que o genoma viral seja liberado e cedido para a tradução, após a entrada numa nova célula hospedeira (Murray et al., 2008). A glicoproteína do envelope Erns, apresenta atividade RNase intrínseca, sendo encontrada apenas associada ao

vírião. Esta glicoproteína participa do processo de adesão do vírus à célula, ligando-se a glicosaminoglicanos. A proteína estrutural E1 é uma glicoproteína transmembrana, que forma heterodímeros com E2, a principal glicoproteína do envelope viral. Adicionalmente, encontra-se envolvida na adesão viral, ligando-se a proteínas de membrana (Potgieter, 2004).

Dentre as proteínas não estruturais pode-se citar a p7, uma pequena proteína que, apesar de não integrar o vírião, é essencial para a sua montagem. A produção de partículas infecciosas requer ações pouco definidas das proteínas não-estruturais p7 e NS2 (Murray *et al.*, 2008). A proteína não-estrutural NS2 é uma proteína hidrofóbica que só é funcional sob a forma do seu precursor, desempenhando um papel crucial, mas indefinido, na produção de vírions infectantes (Lackner *et al.*, 2005). NS3 é uma proteína hidrofílica que possui, pelo menos, três atividades enzimáticas: helicase, NTPase e a atividade serino-protease da sua proteína precursora, NS2-3 (Potgieter, 2004). Juntamente com o seu co-factor, a proteína não-estrutural NS4A, a NS3 realiza o restante do processamento das proteínas não-estruturais. A proteína NS4B encontra-se implicada na atenuação da citopatogenicidade do BVDVA proteína não-estrutural NS5A é uma fosfoproteína que se encontra fortemente associada a uma ou mais cinases celulares. A proteína NS5B é uma RNA-polimerase dependente de RNA, que compõe um complexo de replicação responsável pela replicação viral, que inclui quatro outras proteínas não-estruturais, entre as quais a NS3 (Murray *et al.*, 2008).

O BVDV pode ser agrupado em dois genótipos (BVDV-1 e BVDV-2), cada um com vários subgenótipos. Atualmente, encontram-se identificados, pelo menos, 15 subgenótipos do BVDV-1 (1a a 1o) e 4 subgenótipos do BVDV-2 (2a a 2d) (Xue *et al.*, 2008). A tipificação filogenética dos isolados desse vírus é geralmente feita por comparação de sequências de bases correspondentes à região 5'UTR e às regiões codificadoras de Npro e E2, consideradas as regiões gênicas mais conservadas do genoma viral (Hornberg *et al.*, 2009).

Ambos os genótipos podem apresentar diferentes biotipos: o citopatogênico (CP) e o não citopatogênico (NCP), que possuem virulência variada. Essa diferenciação foi realizada de acordo com a capacidade destes de induzir morte celular em cultura de células ou não induzir efeito citopático (Perterhans *et al.*,

2010). A replicação dos biotipos NCP não induz alterações relacionadas ao vírus, como alteração na morfologia e viabilidade celular, enquanto que os biotipos CP causam vacuolização e morte da célula infectada (Bolin e Grooms, 2004). Ambos os biotipos podem causar infecções agudas, mas apenas o vírus NCP é capaz de estabelecer infecções persistentes (pela propriedade de atravessar a barreira hemato-placentária), responsáveis pela manutenção do BVDV nas populações. O biotipo clássico e mais prevalente na natureza é NCP (Bolin e Grooms, 2004), além de ser mais virulento e certamente o causador de manifestações clínicas mais severas (Peterhans *et al.*, 2010). Um passo decisivo no entendimento dos biotipos existentes foi a descoberta de que o precursor p125 está presente tanto em amostras NCP quanto nas CP; porém, somente nas CP a p125 é clivada em p54 e p80. A proteína p80 é imunodominante, induzindo forte resposta imunológica em todos os animais infectados com amostras CP. A proteína p54 é uma das menos conservadas e a p80 uma das mais conservadas entre as amostras conhecidas de *Pestivirus*. Em amostras CP, a região codificante de p54 possui inserção de sequências das células hospedeiras, sugerindo que esta região está sujeita à recombinação genética com material genético não viral (Bolin e Grooms, 2004).

Em comparação com os vírus DNA, os vírus RNA são altamente mutáveis. Os vírus RNA que apresentam senso positivo, como o BVDV, estão sujeitos a modificações genômicas que envolvem mutações pontuais ou recombinação do RNA viral. As mutações pontuais são extremamente comuns, uma vez que as polimerases virais são incapazes de detectar ou reparar os erros ocorridos durante a replicação, como acontece nos vírus DNA (Goens, 2002). Assim, a cada ciclo de replicação geram-se mutantes. No caso do BVDV, a recombinação não tende a criar novos genótipos, e sim biotipos virais (Bolin e Grooms, 2004)

3.2. Aspectos epidemiológicos

Os *Pestivirus* infectam principalmente animais biungulados (ordem *Artiodactyla*). Os biungulados são bastante diversificados e incluem animais domésticos como bovinos, ovinos e camelídeos do velho e novo mundo; e, animais selvagens como os antílopes e veados (Peterhans *et al.*, 2010). A

infecção pelo BVDV é endêmica nas populações de gado bovino, na maioria dos países. Em alguns países europeus é considerada a infecção viral mais importante do gado (Radostits *et al.*, 2007).

O BVDV apresenta distribuição mundial e a prevalência de anticorpos chega a 70 a 80% nos animais testados. Em rebanho na América do Norte e em alguns países europeus este número está próximo de 80%. Em países que são livres do vírus da Febre Aftosa, o BVDV é considerado o agente viral mais importante de bovinos e tem sido alvo de numerosos estudos e de programas de controle e erradicação durante décadas (Flores *et al.*, 2005).

Cerca de 60% dos animais em regiões onde o BVDV é endêmico e não influenciado por medidas de controle são transitoriamente infectados em algum momento de suas vidas. Estes animais podem sofrer de diarreia ou doença respiratória, sintomas generalizados ou, então, infecção subclínica. Após a soroconversão, os animais tornam-se protegidos contra a reinfeção por toda a vida (Bachofen *et al.*, 2010).

No Brasil, diferentes relatos clínicos demonstram a presença da infecção a partir da década de 60 (Correa, 1968). Desde então, com base em estudos sorológicos relata-se que o BVDV se apresenta disseminado no gado brasileiro (Flores *et al.*, 2000). Atualmente, há grande dificuldade em relatar a situação epidemiológica desse agente, devido à ênfase dada ao vírus da Febre Aftosa durante muitos anos, a falta de técnicos treinados e à ausência de reagentes apropriados para o diagnóstico da infecção. Podendo, ainda, ocorrer uma subnotificação dos casos, principalmente os subclínicos. Outro desafio está relacionado à dificuldade de se avaliar o impacto econômico da infecção pelo BVDV apenas com base em relatórios clínicos de surtos da doença, devido as diversas variações como por exemplo no manejo de cada rebanho (Botton *et al.*, 1998).

Nos estudos de prevalência de BVDV no Brasil, em tipos de criações e regiões geográficas distintas foram encontrados resultados similares de prevalência de rebanho para enfermidade que variaram de 40% a 90% (Canal *et al.*, 1996, Poletto *et al.*, 2004., Thompsom *et al.*, 2006, Quincozes *et al.*, 2007).

Um estudo realizado em 2009 na região de Uberaba determinou uma prevalência de 71,42% para BVDV nas 126 vacas avaliadas (Mendes *et al.*, 2009). No mesmo ano, Stott e colaboradores demonstraram que a propagação do vírus dentro de um rebanho é influenciada por práticas de gestão e re-introdução de novos animais no rebanho. Esses fatores devem ser considerados para a avaliação econômica e estratégias, pois podem ter um impacto na disseminação do BVDV (Viet *et al.*, 2010).

Em 2010, Brito e colaboradores examinaram amostras de soro de 3.533 bovinos procedentes de 232 municípios do estado de Goiás e encontraram uma soroprevalência de 64% em 784 amostras de soro e de 88,3% nas propriedades. Dos municípios estudados, 226 (97,4%) apresentaram, pelo menos, um animal soropositivo por rebanho (Brito *et al.*, 2010). Ainda em 2010, Dias e colaboradores testaram 1.925 amostras de soro sanguíneo obtidas de rebanhos bovinos naturalmente infectados e não vacinados contra o BVDV, provenientes dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Ficou demonstrada a ocorrência da infecção pelos diferentes genótipos do vírus, confirmando assim, a circulação de ambos os genótipos nos rebanhos brasileiros.

3.2.1. Formas de transmissão

O BVDV pode ser transmitido a partir de animais infectados para os susceptíveis por várias vias: contato direto entre os animais ou indireto com secreções, excreções, feto abortado, placenta, agulhas, material cirúrgico contaminado, luvas de palpação e por sêmen contaminado. Em relação à transmissão via sêmen, ocorre por meio da monta natural e da inseminação artificial (Carter, 2004). Além disso, a infecção transplacentária é freqüente e leva o nascimento de animais PI (Figura 3) ou imunotolerantes (IT), que constituem a principal fonte de disseminação do vírus pelo fato de o excretarem no ambiente ao longo de toda a vida. Os animais que se tornam infectados também excretam o vírus na fase aguda da doença (Flores *et al.*, 2005).

Como o BVDV pode ser transmitido via sêmen, é necessária a avaliação e triagem deste material clínico para evitar que novos animais sejam infectados (Fray *et al.*, 2000). Não somente o sêmen como outros produtos biológicos

criopreservados, como os embriões, constituem uma importante fonte de transmissão do vírus (Fray *et al.*, 2000). O BVDV é eliminado no sêmen, tanto de touros PI (10^7 TCID₅₀/ml) como de touros TI (5 a 75 TCID₅₀/ml). O vírus sobrevive ao processo de criopreservação do sêmen, podendo ser transmitido a fêmeas soronegativas por inseminação artificial (Noiva, 2010). A dose infectante mínima determinada para esta via de transmissão é de 25-50 TCID₅₀/ml (Bielanski *et al.*, 2009). O BVDV também pode estar presente no leite utilizado nos diluidores de sêmen à base de leite. Todavia, o tratamento térmico apropriado deste leite elimina o risco de transmissão do vírus (Noiva, 2010).

Os animais PI tem um papel chave na transmissão e manutenção do vírus por serem a principal fonte de transmissão do BVDV. Estes disseminam o vírus ao longo de toda a vida em elevadas quantidades em secreções nasais, leite, lágrima, urina, fezes e sêmen. A disseminação do vírus praticamente pára quando estes são removidos, o que torna possível a erradicação do BVDV do rebanho sem que seja necessário adotar medidas especiais para verificar se os animais com infecções transitórias ainda estão propagando o vírus (Lindberge Houe, 2005).

Por fim, a presença do vírus da diarreia viral bovina em subprodutos de origem animal, como o soro fetal de bovino (SFB), e a utilização destes produtos para a produção de vacinas vivas, proporciona vias adicionais para a disseminação do vírus entre os rebanhos. Os produtos biológicos (vacinas, embriões e sêmen) contaminados com o BVDV apresentam um enorme potencial para transmitir o vírus, não só entre rebanhos vizinhos, como entre regiões, países e continentes. As vacinas ou sêmen de um único lote/touro poderão ser utilizados em vários animais, de diversos rebanhos, com graves consequências (Lindberg e Houe, 2005).

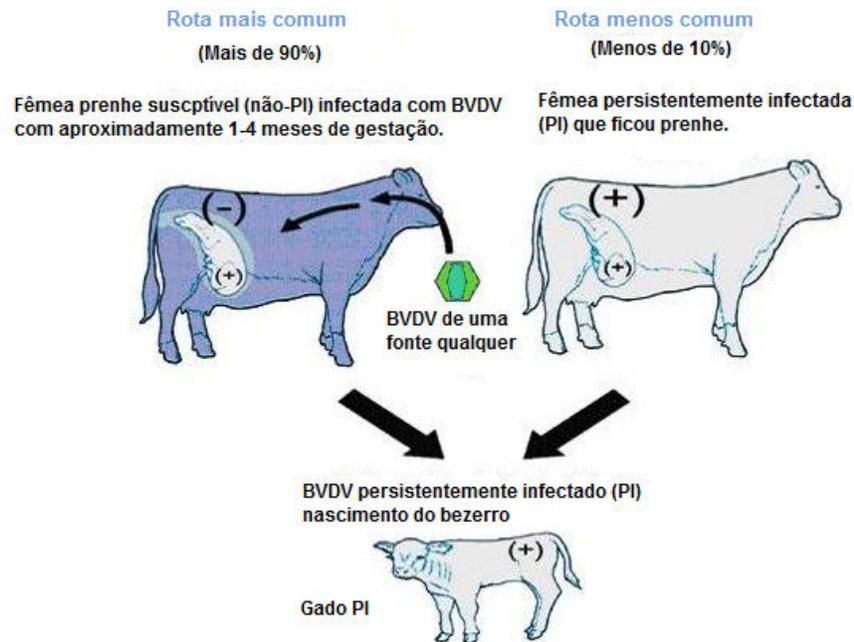


Figura 3. Vias de nascimento de animal PI. (Fonte: Adaptado de Alliance Nutrition Beff, 2005).

3.3. Fisiopatologia

O BVDV apresenta um amplo tropismo tecidual, possuindo uma maior afinidade por tipos celulares do sistema imune como os linfócitos e células apresentadoras de antígenos. Devido à permissividade destas células pode causar alterações como: leucopenia, neutropenia e trombocitopenia (Rhodes *et al.*, 1999).

A adesão do vírus às células-alvo envolve a interação das glicoproteínas Erns e E2 com glicosaminoglicanos (ex. sulfato de heparano) e proteínas de membrana, respectivamente. Os receptores celulares do BVDV incluem o CD46 e o receptor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-R) (Krey *et al.*, 2006). A função das células apresentadoras de antígeno e a produção de interferon (IFN) são particularmente afetadas (Noiva, 2010).

A glicoproteína estrutural E2 é o componente mais imunogênico do BVDV, induzindo a síntese de anticorpos neutralizantes. O vírus apresenta, também, tropismo para o ovário, testículo e sistema nervoso central (Noiva, 2010).

Clinicamente, a infecção pelo BVDV tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações clínicas variando desde infecções assintomáticas, sinais leves até doença aguda fatal. A influência que o BVDV exerce sobre a reprodução e a fertilidade torna-se evidente, mesmo antes da concepção (Grooms, 2004). Nos machos, a infecção aguda pelo BVDV dá origem a orquites crônicas, que podem durar, pelo menos, 2,75 anos, período durante o qual o vírus é eliminado no sêmen, podendo ser transmitido a fêmeas soronegativas durante a monta natural ou por inseminação artificial (Givens *et al.*, 2009; Marley *et al.*, 2009). Os machos PI eliminam, da mesma forma, o vírus no sêmen (Houe, 1992).

Após a implantação, a infecção transplacentária do feto pode levar de um a cinco consequências (Figura 4): aborto, desenvolvimento de imunotolerância ao vírus, malformações congênitas, nascimento de animais soropositivos saudáveis, e nascimento de animais doentes soropositivos (Bolin e Grooms, 2004).

Os fetos que sobrevivem à infecção com o vírus não citopatogênico, entre os 18 e 125 dias de gestação, tornam-se, invariável e especificamente, imunotolerantes à variante viral a que foram expostos, convertendo-se em animais persistentemente infectados pelo Vírus da diarreia viral bovina (Bolin e Grooms, 2004). Ao contrário do biotipo não citopatogênico, o vírus citopatogênico não possui a capacidade de estabelecer infecção persistente após exposição durante o período crítico para o desenvolvimento de imunotolerância (Fray *et al.*, 2000). O mecanismo exato pelo qual se estabelece a imunotolerância ao vírus não está totalmente elucidado, mas sabe-se que a circulação do vírus durante o período da gestação em que o sistema imune se desenvolve (90 a 120 dias de gestação) é um pré-requisito para o estabelecimento da persistência (Bolin e Grooms, 2004). A estratégia de burlar o sistema imune adaptativo através do estabelecimento de tolerância é pouco comum e permite que o vírus seja extremamente bem-sucedido, sem que tenha que empregar estratégias de evasão habitualmente observadas em

outras infecções virais persistentes de animais imunocompetentes. Estes bezerros geralmente são soronegativos para o vírus, podendo ser clinicamente normais, e excretam o vírus continuamente em grandes quantidades em secreções e excreções (Brownlie, 1990). Devido a isso, são considerados o ponto-chave da epidemiologia da infecção e a sua identificação e remoção constitui etapas essenciais para o controle ou erradicação do BVDV dos rebanhos (Flores *et al.*, 2005).

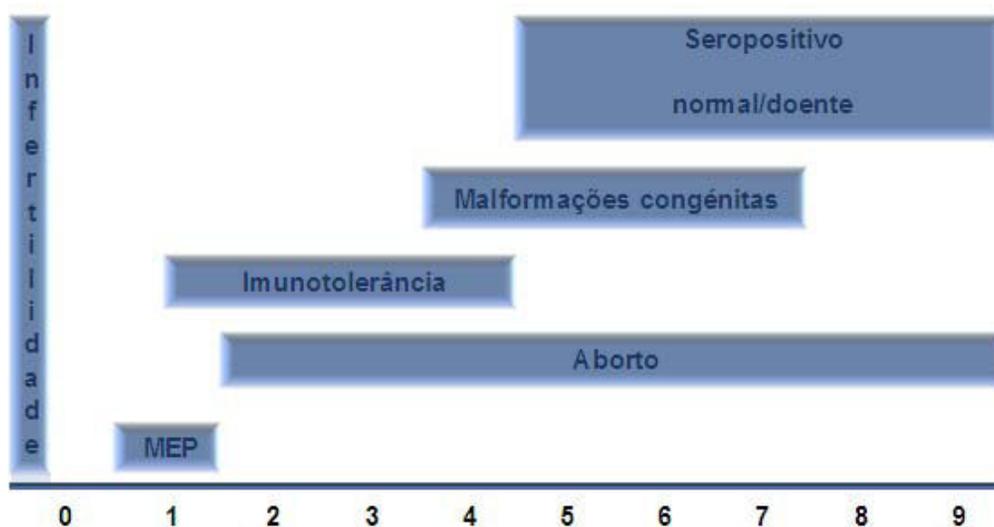


Figura 4. Possíveis consequências da infecção pelo vírus da Diarréia Bovina Viral sobre a reprodução (adaptado de Grooms, 2004).

MEP: morte/ perda embrionária

A supressão, parcial ou total, da produção de IFN em resposta à infecção pelo vírus não citopático pode permitir que as proteínas virais sejam reconhecidas como antígenos próprios, o que resulta na rejeição e destruição de linfócitos B e T anti-BVDV, durante a criação do sistema imunitário adaptativo (Noiva, 2010). Assim sendo, os animais persistentemente infectados não apresentam quaisquer anticorpos, sendo estes neutralizantes ou não, contra o vírus persistente. Isto não impede, contudo, que um animal PI apresente anticorpos anti-BVDV (Grooms, 2004).

A doença das mucosas é uma manifestação clínica rara fatal que atinge animais que se tornaram persistentemente infectados. A doença irá ocorrer quando o animal é exposto a um vírus antígenicamente diferente daquele em que teve contato no período fetal. Estes dois vírus são antígenicamente idênticos e constituem um “par viral” (Carter, 2004; Potgieter, 2004). Quando a mutação ocorre num animal PI com BVDV não-citopático, a população de vírus mutados (citopáticos) expande-se, e ambos os biotipos passam a coexistir no hospedeiro (Goens, 2002).

Os fatores que influenciam o curso da doença das mucosas não são conhecidos e não se encontra estabelecida uma relação entre o período de incubação da doença e a duração dos sinais clínicos. O animal irá desenvolver um quadro sintomático com febre, diarreia, depressão, anorexia, emaciação e desidratação, acidose e diminuição na produção leiteira. O nome da doença é característico das erosões nos lábios, gengivas, língua, palato, rebordo dentário e comissuras labiais, que após a convalescença se tornam necróticas. Acrescida a este quadro ocorre uma diarreia profusa após o aparecimento dos sinais clínicos, podendo ou não ser sanguinolenta. Há um efeito necrosante em todo o trato gastroentérico, órgãos linfóides e pele (Potgieter, 2004; Radostits *et al.*, 2007).

Setenta a 90% dos animais imunocompetentes infectados pelo BVDV não desenvolvem sinais clínicos clássicos da doença. Um exame clínico minucioso destes animais pode revelar leucopenia, pirexia ligeira e, em algumas vacas, queda da produção leiteira. Alguns animais podem ainda apresentar inapetência e diarreia (Radostits *et al.*, 2007).

O termo “Diarreia viral bovina” aplica-se aos casos de infecção primária em que os animais exibem sinais clínicos evidentes. A doença apresenta surtos de diarreia aquosa de gravidade variável, que normalmente envolvem animais de rebanhos susceptíveis, entre os 6 e os 12 meses de idade. A morbidade varia entre os 30 e os 90%, enquanto a mortalidade é, geralmente, inferior a 8% (Potgieter, 2004).

A infecção embrionária/fetal pelo BVDV tende a refletir-se nos parâmetros reprodutivos das fêmeas (Carter, 2004; Radostits *et al.*, 2007). As taxas de

aborto geralmente variam entre os 2 e os 7%, podendo atingir os 27% (Potgieter, 2004).

3.4. Diagnóstico

Embora a infecção pelo BVDV possa apresentar sinais clínicos, estes podem ser confundidos com os causados por outras doenças, o que torna mais necessária a investigação laboratorial. Os exames laboratoriais são essenciais e devem ainda ser utilizados de forma planejada e complementar para fornecerem uma informação útil sobre o agente (Sandvik, 2005). Os exames variam de acordo com sua modalidade que este possa ser inserido: isolamento do vírus, detecção do antígeno viral, detecção de RNA viral e detecção de anticorpos. Como em qualquer diagnóstico, o clínico nunca deve depender de um único teste para obter a resposta correta em todos os casos. A utilização de múltiplos testes em várias amostras é sempre a melhor abordagem (Salik, 2004).

3.4.1. Isolamento viral

Historicamente, o isolamento viral em cultura de células de bovinos tem sido utilizado como padrão ouro em comparação com os outros testes disponíveis (Ridpath, 2010). Porém, este exige uma estrutura física laboratorial mais complexa para diagnósticos de rotina (Rocca, 2009).

O BVDV pode replicar-se em diferentes tipos de cultivos celulares. Entre os mais sensíveis cultivos celulares estão as culturas de rim bovino primário, tendo como suplemento o soro fetal bovino livre de BVDV e anticorpos específicos (Sandvik, 1999).

As amostras citopatogênicas causam alterações celulares características, que são visíveis após cerca de 48 horas de incubação (Radostits *et al.*, 2007). Setenta a 90% dos isolados de BVDV pertencem ao biotipo não citopatogênico

necessitando de um segundo teste para detecção do vírus (Carter, 2004; Saliki e Dubovi, 2004).

Os anticorpos maternos levam à diminuição da viremia, interferindo com o isolamento do vírus e dando origem a resultados falso negativos. Outras desvantagens do isolamento viral relacionam-se com os seus custos e com a necessidade de re-testagem dos positivos após 3 ou 4 semanas, para distinção entre animais PI e TI (Larson *et al.*, 2005).

No animal vivo, a melhor amostra para isolamento do BVDV é o sangue total. Podem ser utilizadas também a camada leucocitária ou soro/plasma. Para testagem de um grande número de animais, as culturas de células são inoculadas com soro/plasma dos animais e utiliza-se com recurso as técnicas de PCR ou da imunoperoxidase (Saliki e Dubovi, 2004).

3.4.2. Detecção de antígeno

Apesar de muito precisas na detecção de animais PI, as técnicas de ELISA e imunoperoxidase não são sensíveis para o diagnóstico de infecções agudas. A maior limitação destas técnicas na detecção de animais PI é o fato de não poderem ser aplicadas em animais com menos de 3 meses (Saliki e Dubovi, 2004). A produção de anticorpos neutralizantes por estes animais, após contato com isolados antigenicamente diferentes, pode igualmente causar oscilações da viremia e interferir com a técnica.

A detecção direta do antígeno viral em amostras suspeitas é mais rápida e econômica que o isolamento viral. Atualmente, encontram-se disponíveis dois tipos de técnicas diretas: ensaio de ELISA para captura de antígeno (AgELISA) e técnicas de imunomarcção de tecidos frescos ou fixados em formol (Saliki e Dubovi, 2004).

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) para detecção do BVDV recorre a anticorpos poli- ou monoclonais para detectar uma ou várias proteínas virais numa variedade de tecidos e órgãos, congelados ou fixados em formol, podendo ser usada no diagnóstico de infecções agudas e persistentes, em

animais de qualquer idade. A imunohistoquímica pode ser usada como um meio de confirmar a infecção pelo BVDV na ausência de isolamento viral, sendo útil na investigação de surtos de doenças do trato entérico, respiratório e reprodutivo (Radostits *et al.*, 2007). A sensibilidade e especificidade desta técnica variam entre os 97 e os 100%, sendo necessário testar os animais apenas uma vez (Noiva, 2010). A imunohistoquímica apresenta como principais desvantagens o intenso trabalho laboratorial de preparação, processamento e análise das amostras, e o fato da interpretação dos resultados se basearem em critérios subjetivos (Cornish *et al.*, 2005).

A detecção do antígeno do BVDV, pela de imunofluorescência, em amostras de tecido congelado, também pode ser utilizada como método de diagnóstico. A sensibilidade desta técnica é aproximadamente 77%, sendo a especificidade em torno de 88% (Saliki e Dubovi, 2004).

3.4.4. Diagnóstico sorológico

Quando bem aplicados, os testes sorológicos podem ser usados para: determinar a eficácia de uma vacina, averiguar o cumprimento dos protocolos de vacinação, determinar o estatuto de um rebanho quanto à exposição ao BVDV e associar a presença do BVDV com a ocorrência de sinais clínicos. Vários testes sorológicos foram adotados para o diagnóstico de BVDV. Estes incluem a imunodifusão em gel de agarose, a fixação de complemento, a imunofluorescência indireta, a neutralização viral (NV), o ELISA para detecção de anticorpos (AcELISA) e o *Western blotting* (Sandvik, 1999).

A detecção de anticorpos contra o BVDV é amplamente utilizada como um importante parâmetro para avaliar a resposta imune induzida pela infecção, seja ela natural ou por meio de vacinação. Os testes sorológicos são excelentes para levantamentos epidemiológicos e monitoria de rebanhos. Os principais antígenos virais capazes de induzir resposta imune humoral são as glicoproteínas Erns e E2 e a proteína não estrutural NS2-3 (Almeida, 2010).

Anticorpos para BVDV podem ser detectados por vários métodos, incluindo o teste de soroneutralização viral e ELISA. O primeiro é um teste sensível e específico para a detecção de anticorpos anti-BVDV, sendo reconhecido como

teste sorológico de referência para este vírus. No entanto, constante monitoramento de cultivos e meios de crescimento celulares é requerido com o objetivo de verificar possíveis contaminações com o biotipo NCP do BVDV e, para triagem de grandes rebanhos, este se torna laborioso e demorado, devido ao pouco número de animais testados por placa, tendo em vista as diluições requeridas (Serra, 2002).

Os ensaios de ELISA são métodos diagnósticos versáteis e bastante sensíveis quando comparados com a soroneutralização viral, por não requererem cultivos celulares, serem realizados em poucas horas e facilmente aplicáveis como método de triagem. A especificidade de tais sistemas é determinada pela escolha do antígeno viral, que inclui partículas víricas purificadas, culturas inoculadas com o BVDV, antígenos virais imobilizados com anticorpos monoclonais ou proteínas virais recombinantes produzidas em bactéria. No entanto, embora kits estejam disponíveis comercialmente, não são ainda economicamente viáveis para a triagem de rebanhos (Serra, 2002).

3.4.5. Detecção de ácidos nucléicos

Os métodos moleculares, desde que devidamente padronizados e certificados, apresentam altas taxas de sensibilidade e especificidade. Devido a essas características, a PCR, precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR), tem sido muito utilizada para o diagnóstico das formas de manifestações clínicas da infecção pelo BVDV, além da detecção de animais PI a partir de amostras biológicas individuais e em *pools* de soros sanguíneos (Pilz *et al.*, 2007).

Os testes de RT-PCR geralmente não são utilizados na rotina. No entanto, para a análise de amostras individuais, monitoramento de animais PI, e em infecções primárias agudas, onde a produção de anticorpos ainda não alcançou um limite detectável, torna-se bastante útil. Outra aplicação diagnóstica de grande importância tem sido o monitoramento de soros fetais bovinos e cultivos celulares possivelmente contaminados com amostras NCP do vírus (Serra, 2002).

Os métodos de detecção rápida do BVDV em amostras de sangue de bovinos, têm como alvo o genoma e normalmente utilizam a região 5' UTR (untranslated region) , constituída de 361 a 386 bases. Esta é uma das regiões mais conservadas e portanto, é um alvo conveniente para a RT-PCR (Sandvik 2009). Além disso, é frequentemente utilizada em análises filogenéticas. Assim, a RT-PCR pode ser aplicada como ferramenta de diagnóstico do BVDV para monitorar culturas de células infectadas, sangue, leite, sêmen, fluido fetal; assim como em estudos moleculares como os de expressão gênica, e aqueles que visam obtenção de modelos para análise de sequências ou para a construção de clones e replicons. Para a maioria das abordagens mencionadas acima, algumas regiões selecionadas do genoma do BVDV são o alvo para a amplificação(Vilcek *et al.*, 2004).

Há muitos relatos que descrevem o uso da região 5'UTR para a classificação de um isolado em dentro do gênero *Pestivirus* (Noiva, 2010). O RNA viral pode ser facilmente detectado em quase todas as amostras clínicas. Diversos cuidados devem ser tomados para assegurar que os iniciadores utilizados sejam capazes de detectar tanto BVDV-1 quanto BVDV-2, incluindo todos os subgrupos genéticos relevantes do vírus (Sandvik, 2005).

3.5. Controle, prevenção e tratamento

Não existe tratamento específico para qualquer das doenças associadas à infecção pelo vírus da Diarréia viral bovina. O prognóstico para animais com casos severos de Doença das Mucosas, com quadro de diarréia aquosa profusa e lesões orais graves é desfavorável e o abate destes animais deve ser considerado. Animais com BVD crônica devem ser abatidos (Radostits *et al.*, 2007).

O principal objetivo de controle do BVDV reside na redução das perdas de produção associadas à infecção de um rebanho. Isto se torna possível através da implementação de programas sanitários que visam limitar a exposição dos animais ao vírus, evitando a presença de animais PI e reforçando a imunidade através da vacinação (Kelling, 2004).

Os benefícios da eliminação do BVDV no rebanho incluem a redução das perdas associadas à morte e à doença e o aumento da produtividade e da desempenho reprodutivo. Em certos sistemas produtivos, a demonstração da ausência de animais PI poderá resultar num aumento do valor comercial dos reprodutores ou de animais destinados a outros sistemas produtivos (ex., explorações de terminação) (Smith, 2004).

O objetivo de um programa de biossegurança na criação de bovinos contra o BVDV reside na prevenção da introdução do vírus no rebanho e da sua transmissão a animais susceptíveis, através de fômites, produtos biológicos e contato com animais externos à exploração e através da aquisição de animais infectados. Idealmente, a aquisição de animais provenientes de explorações livres do BVDV, juntamente com a compra de animais comprovadamente não-PI, eliminaria o risco de exposição ao vírus por esses animais (Smith, 2004).

Devido à variabilidade antigênica entre os genótipos BVDV-1 e BVDV-2, foram desenvolvidas vacinas que contêm ambos os genótipos do vírus, como forma de assegurar a proteção contra a infecção sistêmica pelo mesmo (Kelling, 2004). Não existe uma vacina padrão para o BVDV, encontrando-se disponíveis no mercado diversas preparações comerciais, pertencentes a duas classes: vacinas vivas modificadas e vacinas inativadas (OIE, 2008). A principal vantagem das vacinas vivas modificadas, em geral, é a ativação de todo o sistema imune, resultando numa resposta imune local e sistêmica, tanto humoral, quanto celular, e estimulando a produção de elevadas concentrações de anticorpos neutralizantes (Kelling, 2004). O maior benefício das vacinas inativadas é a sua segurança, uma vez que não são, nem imunossupressoras, nem patogênicas para os fetos. As desvantagens deste tipo de vacinas incluem baixos títulos de anticorpos neutralizantes e menores períodos de proteção imune, necessitando de uma maior frequência nas administrações. Adicionalmente, as vacinas inativadas tendem a desencadear respostas de células T citotóxicas mais fracas, quando comparadas com as vacinas vivas modificadas. Além da resposta imune gerada pela vacina, da reatividade cruzada e da duração da imunidade, é necessário considerar outros fatores na

escolha das vacinas que estão no mercado, como, por exemplo, a eficácia na proteção fetal (Kelling, 2004).

Um estudo realizado por Makoschey e colaboradores em 2004, teve como objetivo avaliar a possibilidade de uma amostra padrão de BVDV-1 com deleção na região 5' UTR ser eficaz como vacina atenuada. A infecção com estes vírus mutantes induziram títulos moderados a altos de anticorpos neutralizantes contra BVDV e impediu completamente a viremia após desafio a infecção com uma cepa de BVDV heteróloga. Contudo, concluiu-se que os mutantes 5' UTR possuem confiabilidade, com boa eficácia e, portanto, são adequados como candidatos a vacinas vivas.

Durante a última década, o impacto na produção bovina causado pela infecção do vírus BVD tornou-se progressivamente mais aparente, e os programas de controle, que visam à erradicação do BVDV, consequentemente atraíram um crescente interesse. Assim, os programas de controle que são baseados na remoção dos animais PI atuam com uma redução comprovada da prevalência do BVDV (Sandvik, 2005), sendo para esta prática, imprescindível que se trabalhe com testes diagnósticos sensíveis e específicos.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver e padronizar o método de RT-PCR, usando a região 5'UTR do genoma viral para a detecção de BVDV-1 e BVDV-2 em sêmen bovino utilizando a região 5' UTR.

4.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar análises *in silico* para o desenho dos iniciadores e estudo das condições de PCR;
- ✓ Expandir as amostras virais padrão em cultura celular;
- ✓ Clonar parte da região não traduzida 5' UTR de amostras de BVDV em vetor plasmidial pGEM-T easy;
- ✓ Padronizar os ensaios de PCR para amplificação da região de trabalho escolhida;
- ✓ Gerar curva de sensibilidade de detecção da região clonada para utilização como controle positivo.

5. Metodologia

5.1. Células e Vírus

Para a realização dos experimentos que envolveram expansão viral foram utilizadas as células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney Cells* -ATCC CCL-22). A manutenção das células foi feita por passagens semanais. As células foram cultivadas em frascos de cultura de tecido com área de 75cm² contendo meio *Eagle's minimum essential medium* (MEM) (GibcoBRL, EUA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico / antifúngico (2µg/mL estreptomicina, 2U/mL penicilina e 10µg/mL anfotericina B). As células foram mantidas em estufa à 37° C, 5% de CO₂, 95% de umidade por 24-48h. Após esse período, as células foram repicadas, calculando-se 70.000 células/cm², até a obtenção de uma monocamada celular com confluência entre 90 e 100%.

Neste estudo, foram utilizadas duas amostras padrão de BVDV-1: uma citopatogênica NADL (ATCC VR-534) e uma não citopatogênica NY-1 (ATCC VR-1561); e uma de BVDV-2 SV253 (cedida gentilmente pelo Dr. Eduardo Flores – UFSM). Foram realizadas passagens sucessivas das amostras selecionadas em linhagem de células MDBK para expansão viral e posterior titulação. O título viral presente na suspensão foi calculado com uma TCID₅₀ (50% *tissue culture infective doses*), segundo Reed e Muench (1938) na mesma linhagem celular.

5.2. Infecção experimental do BVDV em amostras de sêmen de bovino

Para avaliar a sensibilidade da PCR desenvolvida para a detecção do BVDV, foi realizada a inoculação experimental *in vitro* de três amostras de sêmen de bovinos procedentes do banco de sêmen do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG. O BVDV-NADL foi diluído na base 10, sendo realizadas diluições 10¹ a 10⁴. O sêmen não infectado foi utilizado como controle negativo.

Após a infecção, as amostras foram mantidas sob agitação 100X g por 1 hora e 30 minutos a 37° C e posteriormente centrifugadas a 800X g por 10 minutos. O sêmen foi filtrado individualmente, em coluna de *Sephacryl S-400*

(Gomes *et al.*, 2003). Inicialmente, realizou-se a lavagem das colunas com 200 μ L de solução de acetato de sódio (3M, pH 6,0) e centrifugou-se a 1600X g por 1 minuto, sendo este procedimento realizado três vezes. Em seguida foram transferidos 500 μ L do sêmen a ser analisado e centrifugou-se a 1600X g por 3 minutos. As amostras foram armazenadas a 4° C para o uso subsequente.

5.3. Extração do RNA total

A partir da cultura celular de MDBK e de amostras de sêmen bovino inoculados experimentalmente com BVDV foi realizada a extração de RNA total pelo método *Tri-reagent* (Sigma, Brazil). Para a extração de RNA da monocamada de células, estas foram congeladas e descongeladas três vezes e a partir desta suspensão celular o RNA foi extraído. Este procedimento não é necessário para as amostras de sêmen bovino. Logo, a massa celular e o sêmen bovino foram ressuspensos em *Tri-reagent*, 1mL para cada 5×10^6 células, e em seguida a extração foi feita seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração as amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro (*nanodrop* Thermo Scientific, EUA) e armazenadas a -70°C até a síntese do DNA complementar (cDNA).

5.4. Iniciadores Específicos

A amplificação do cDNA correspondente à parte da região não traduzida 5' UTR foi feita por PCR precedida de RT-PCR. Para tanto, foi utilizado o programa *Oligo Primer Analysis* (<http://www.oligo.net/>) para o estudo das condições da PCR. O tamanho esperado do amplicon bem como as sequências dos iniciadores\ estão apresentados na tabela 1. Como base para este estudo foram as sequências das duas amostras padrão de BVDV-1 (NADL e NY-1) e da amostra de BVDV-2 (SV253). O par de iniciadores desenhado permite a amplificação da região 5'UTR de BVDV-1 e BVDV-2. Análises *in silico* da sequência de nucleotídeos das amostras foram realizadas com o auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e a similaridade entre as sequências foi verificada a partir do programa *Multalin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

Tabela 1: Desenho dos iniciadores e tamanho dos amplicons.

Par de iniciadores	Orientação Sequência	Tamanho do fragmento amplificado
BVDV1/2R	Antisense 5' – GGG CAT GCC CTC GTC CAC -3'	157pb (BVDV-1/2)
BVDV1/2F	Sense 5' – GAG GCT AGC CAT GCC CTT AG – 3'	160pb (BVDV-1/2)

5.5. Iniciadores randômicos

Foram ainda, utilizados para a obtenção do cDNA, iniciadores randômicos (Promega, EUA) para que seja possível a triagem de uma mesma amostra para mais de um agente, caso fosse necessário.

5.6. Transcrição Reversa e PCR

A partir do RNA extraído pelo método Tri-reagente procedeu-se a produção do cDNA (utilizando-se o kit RT-PCR Improm II - Promega, EUA) das amostras teste e amostras controle. Resumidamente, as misturas RNA e iniciadores foram preparadas em microtubos estéreis (5 µL de RNA extraído, 3 µL de iniciador *reverse*, 3 µL de iniciador *forward*), com incubação à 70° C por 5 minutos, seguida de incubação no gelo por 1 minuto. Posteriormente, 9 µL da reação preparada previamente (4 µL de MgCl₂ 25mM, 2 µL de tampão 10X, 2 µL de DNTP mix, 0,5 µL de inibidor de ribonuclease e 0,5 U de transcriptase reversa-Improm II) foram adicionados aos microtubos contendo RNA e iniciadores. Estes foram incubados por 55° C min a 42° C, 5 min a 99° C e 5 min a 4°C. Um volume de 3 µL de cDNA obtido foi usado na reação como molde na reação de PCR.

A amplificação do fragmento alvo do genoma viral foi feita com os iniciadores específico sem um volume final de 20 µL contendo: 10,9 µL de H₂O ultrapura, 2 µL de tampão Taq 10X, 2 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada um dos iniciadores, 200µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs), 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Promega®) e 3 µL de cDNA de cada amostra testada. A reação ocorreu em um termociclador com os seguintes ciclos: 3 minutos a 95° C

seguidos por 35 ciclos a 95° C por 1 minuto, 50° C por 1 minuto e 72° C por 1 minuto e um passo final de extensão a 72° C por 10 minutos.

Os amplicons (20 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 0,09 M; ácido bórico 0,09 M e EDTA 0,002 M) (Sambrook et. al., 2001). E visualizados sob a luz ultra-violeta. O tamanho molecular dos fragmentos obtidos foi estimado pela comparação com a migração eletroforética de padrão de tamanho molecular, 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen – EUA).

Para os ensaios de clonagem, as bandas específicas foram recortadas do gel e picotadas com lâmina de bisturi armazenadas em microtubos, que foram mantidos a -20° C por 30 minutos. Após, foram centrifugados por 5 minutos a 10 000X g. O sobrenadante contendo o DNA foi recolhido e transferido para novo microtubo estéril.

5.7. Clonagem

A clonagem foi realizada para a utilização como controle positivo nos ensaios de PCR. Os produtos de PCR resultantes foram purificados utilizando-se o Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O resultado da extração foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e foto documentado.

5.7.1 Ligação

A região gênica de interesse foi inserida no vetor pGEM-T *easy*, conforme protocolo do fabricante. Brevemente, o produto de PCR purificado - 3 µL (100ng/ µL); 1,0 µL da enzima T4 DNA ligase (6U), 5 µL do tampão de ligação para a enzima T4 DNA ligase (10x) e 1 µL da solução contendo o vetor pGEM-T *easy* (50 ng/µL). A reação foi misturada delicadamente com micropipeta e incubada por 1 hora à temperatura ambiente e em seguida, mantida a 4° C por 18 horas.

5.7.2 Transformação

A transformação bacteriana foi feita seguindo as instruções do manual técnico pGEM-T easy (Promega, EUA). Foram adicionados 100 μ L da suspensão de bactéria (XL-10) competente a um volume de 2 μ L da reação de ligação. Os tubos foram incubados por 30 minutos em banho de gelo. Após esta incubação, procedeu-se o choque térmico incubando os tubos a 42°C por 30 segundos e em seguida por 2 minutos em banho de gelo. Foram adicionados 500 μ L de meio LB (Extrato de levedura 0,5% p/v, Triptona 0,1% p/v, NaCl 0,5% p/v, H₂O qsp) sem antibiótico aos tubos que foram incubados a 37°C, sob agitação de 100X g (agitador orbital - New Brunswick Scientific® C24 – Edison, NJ – EUA) por uma hora e meia. A suspensão bacteriana foi semeada em placa de Petri contendo meio ágar LB (LB - Ágar 1,5% p/v, Extrato de levedura 0,5% p/v, Triptona 0,1% p/v, NaCl 0,5% p/v, H₂O qsp) acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa à 37°C por 16 horas.

5.7.3 Seleção de colônias de bactérias recombinantes

As colônias brancas foram removidas parcialmente e cultivadas em 500 μ L de meio LB 1X (Bacto triptona 1% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, 1% NaCl 171mM) acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina a 37°C sob agitação de 100X g (agitador orbital - New Brunswick Scientific C24 – Edison, NJ – EUA).

5.7.4 Extração e purificação do DNA plasmidial

Diferentes colônias de *E. coli* linhagem XL-10 transformadas com o plasmídeo pGEM-Teasy/BVDV foram cultivadas sob agitação de 100 X g (agitador orbital - New Brunswick Scientific C24 – Edison, NJ – EUA) a 37° C por 16 horas em meio LB 1X acrescido de ampicilina (100 μ g/mL). Os plasmídeos dessas culturas foram extraídos por lise alcalina utilizando o *kit Wizard™ Plus Minipreps - DNA Purificatiom System* (Promega, EUA), conforme recomendações do fabricante. A cultura bacteriana foi centrifugada por 5 minutos, a 4.000X g, em temperatura ambiente e após esse processo o

sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi homogeneizado em 250µL da solução de suspensão. Esta foi transferida para um microtubo, em que foram adicionados 250 µL de solução de lise e submetido à homogeneização, vertendo-se os tubos. A suspensão foi incubada por 5 minutos até ficar com uma coloração mais clara. Em seguida, foram adicionados 10 µL de solução de protease, sendo feita a homogeneização por inversão. Novamente, esta solução foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e acrescida de 350 µL da solução de neutralização, com inversão imediata dos tubos. O lisado foi centrifugado a 10.000X g por 10 minutos à temperatura ambiente e transferido para uma coluna de filtração. Em seguida foi centrifugado a 10.000X g, por 1 minuto à temperatura ambiente. Nesta fase, o DNA plasmidial permanece sob a membrana da coluna, a qual foi lavada por duas vezes com 750 µL de solução de lavagem, previamente diluída com etanol, após centrifugação a 10.000X g por 1 minuto à temperatura ambiente para a remoção de toda solução de lavagem, o filtrado produzido foi descartado. A coluna foi transferida para um tubo tipo *ependorf* estéril, e o DNA foi eluído com 50µl de água ultra pura, livre de nuclease. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 X g, por 1 minuto à temperatura ambiente para obtenção do DNA na solução eluída. O DNA plasmidial foi congelado a -20° C.

A qualidade do DNA plasmidial foi verificada submetendo-se uma alíquota de 3 µl à eletroforese em gel de agarose 1,5% p/v em TBE 1X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2) contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e comparando-se ao marcador de tamanho molecular 100pb *Ladder* (Invitrogen, Brasil). O gel foi visualizado sob iluminação U.V. (320 nm). O DNA dos clones plasmidiais purificados foram também quantificados utilizando o espectrofotômetro *nanodrop* (Thermo Scientific®).

5.7.5 Confirmação da presença do inserto no plasmídeo pGEM-T easy

Para a confirmação da clonagem foi empregada a PCR, utilizando os iniciadores BVDVF1/2 e BVDVR1/2, os mesmos empregados na amplificação inicial da região gênica. A reação foi feita utilizando DNA plasmidial (Tabela 2), 10 pmol de cada iniciador, 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato

(dNTP's), 2,0 µL de tampão 10X, 2 mM de MgCl₂, 0,5 U.I de Taq DNA polimerase (Promega®) e H₂Od estéril q.s.p. 20 µL. Após homogeneização, a reação foi realizada em um termociclador (MJ Research) utilizando os seguintes ciclos: um ciclo inicial a 95°C/3 minutos, 35 ciclos de 95°C/1 minuto, 50°C/1 minuto, e 72°C/1 minuto, com uma extensão final a 72°C/10 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em TBE 0,5X e o produto amplificado foi visualizado por coloração do gel com brometo de etídio sob luz ultra-violeta (320 nm).

Tabela 2. Concentração de RNA total utilizado nos ensaios de clonagem

Amostra	Clone	Dosagem (ng/µL)
NADL	2	115,4
NADL	3	163,2
NY-1	5	171,6
NY-1	6	149,9
BVDV-2 SV 253	7	116,5

5.8 Sequenciamento

Os clones pGEM-T *easy*/BVDV que apresentaram resultados positivos na amplificação por PCR, sendo posteriormente confirmados pela análise por restrição enzimática, foram submetidos ao sequenciamento para a verificação da integridade e identidade genômica do inserto.

O sequenciamento feito pelo método *didesoxi* (Sanger *et al.*, 1977) em sequenciador automático e com iniciador universal M13. Logo após, o resultado foi analisado pelo alinhamento com sequências de BVDV previamente depositadas no *GenBank* no programa *MultiAlin* (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>; Corpet, 1988), e as ambiguidades das sequência foram resolvidas.

5.9. Sensibilidade analítica da PCR

Para determinar a sensibilidade analítica do teste, os clones produzidos foram utilizados como moldes para gerar uma curva de sensibilidade a partir da PCR. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-4} .

6. Resultados e Discussão

O sêmen é um material clínico de grande importância por ser veículo de diversos agentes infecciosos dentre eles o BVDV. A ASBIA relatou, em 2010, um aumento de 11,65% no comércio de sêmen no Brasil. Atualmente, o MAPA mantém a instrução normativa da comercialização do sêmen bovino e bubalino no Brasil somente em unidades registradas que cumpram os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen. O código sanitário para os animais terrestres indica o teste de agentes virais de importância sanitária para os bovídeos em sêmen, preconizando o uso da PCR para BVDV, BTV e BoHV-1. (OIE 2008)

Vários testes diagnósticos têm sido usados para a detecção dos vírus direta ou indiretamente. Porém, há uma recorrente necessidade de desenvolvimento de uma técnica diagnóstica que seja sensível e específica o suficiente para detectar os diferentes biotipos circulantes do BVDV em rebanhos bovinos. É importante que seja feita a detecção precoce do agente viral (Niskanen *et al.*, 1989; Edwards, 1990), com rapidez na execução e liberação do resultado. Este processo pode diminuir prejuízos econômicos significativos nos rebanhos com circulação do vírus.

É importante destacar o desenvolvimento de testes moleculares rápidos e específicos para o diagnóstico de rotina de agentes virais bovinos devido em grande parte aos números da pecuária nacional. (<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS>).

A transcrição reversa é um método molecular comumente utilizado no diagnóstico de vírus que possuem como material genético o ácido ribonucléico. Tem se tornado uma ferramenta indispensável, particularmente devido a sua alta sensibilidade, que possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nas quais os microrganismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou mesmo em amostras altamente diluídas (Pilz *et al.*, 2005). Este é transcrito para cDNA, que possui as mesmas características de uma fita de DNA. Existem duas modalidades de RT uma pode ser realizada em uma única etapa, ou seja, a transcrição reversa e a PCR são realizadas num mesmo tubo, já na outra são realizadas duas etapas primeiro a RT e em seguida a PCR. A vantagem desta segunda técnica seria a possibilidade de se armazenar

o cDNA para uso posterior, além de poder variar os tipos de iniciadores durante a PCR, facilitando a triagem para mais de um agente (Campos, 2010).

Neste trabalho foi padronizado um sistema diagnóstico, utilizando a PCR, para a detecção de BVDV-1 e BVDV-2 em sêmen bovino.

6.1. Padronização da PCR

A partir dos primeiros ensaios foram testados os iniciadores randômicos e específicos, as condições de transcrição reversa e da reação de PCR propriamente dita, para a devida padronização da reação. A sensibilidade da reação de PCR está relacionada a diversos fatores como: enzima, condições da reação (temperatura de anelamento e concentração de $MgCl_2$), região de hibridização dos iniciadores, tipo e qualidade da amostra (revisão de Campos, 2010). Assim, a padronização da PCR foi realizada variando o tipo de iniciador (específicos e randômicos) e a temperatura de anelamento. A temperatura foi testada entre 50°C e 57°C para verificar a amplificação do fragmento específico com tamanho esperado de 157 pb para BVDV-1 e 160 pb para BVDV-2 utilizando o mesmo par de iniciadores (Figura 5). As melhores condições de padronização da PCR podem ser vistas na tabela 3.

Tabela 3. Condições padronizadas para PCR de BVDV

Reagente	Concentração
Água	-
$MgCl_2$	2mM
dNTP <i>mix</i>	200 μ M
BVDV1/2 F	10pmol
BVDV1/2 R	10pmol
Taq DNA <i>polimerase</i>	0,5 U
Molde/ cDNA	3,0 μ L

O $MgCl_2$ é considerado um reagente de importância crítica, doador estável de íons Mg^{2+} , que são co-fatores indispensáveis para atividade da enzima DNA polimerase (Vieira, 2005).

Durante a etapa de anelamento os iniciadores pareiam-se com a fita molde de DNA. Esta fase pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles o tamanho do iniciador, assim como, sua composição de bases, principalmente o alto teor de citosina e guanina, que podem elevar a temperatura de anelamento (Liu *et al.*, 2003). Neste estudo a temperatura de anelamento selecionada foi $50^{\circ}C$, na qual houve aparecimento da banda específica (Figura 5). Contudo, o fragmento do vírus foi amplificado somente quando foram utilizados iniciadores específicos, demonstrando assim, que neste ensaio, o uso de sequências específicas mostrou-se mais sensível. Corroborando estes dados, estudos de Vilcek e colaboradores (1994) que testaram seis pares de iniciadores de diferentes regiões do genoma dos *Pestivirus*. O melhor resultado obtido foi com um par de iniciadores específicos que tinha como alvo a região 5' não traduzida. Não houve diferença significativa na detecção por iniciadores randômicos e específicos. Além disso, variações na temperatura que foram de $46^{\circ}C$ a $56^{\circ}C$ tiveram pouca influência sobre o rendimento final.

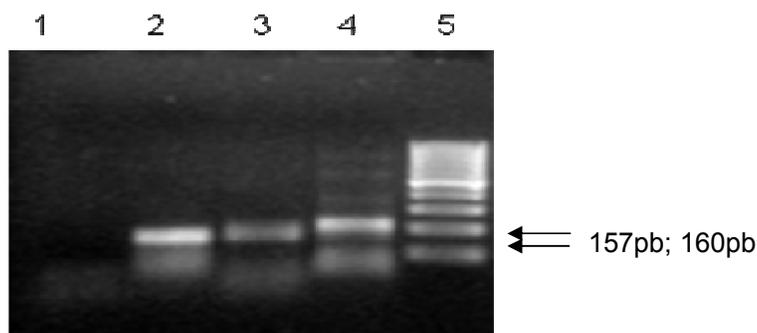


Figura 5. Produtos da região 5' UTR do genoma de BVDV usando iniciadores específicos. Canaletas: 1: controle negativo; 2: NADL 3ª Passagem em MDKB; 3: BVDV-2 SV253; 4: NADL 5ª passagem; 5: padrão de tamanho molecular (Ladder 100pb Invitrogen – Brasil).

Na figura 5 observa-se somente a amplificação da amostra BVDV-2 SV253 na temperatura de $50^{\circ}C$, utilizando iniciadores específicos. Neste estudo foram testadas amostras de suspensões celulares infectadas com os 3 vírus, em

diferentes condições de temperatura de anelamento . Este resultado mostra a baixa sensibilidade dos iniciadores randômicos para a detecção do BVDV.

No presente estudo, foi escolhida uma região altamente conservada nos pestivirus. Estudos anteriores demonstraram a utilização da 5' UTR para padronização do teste PCR precedida por transcrição reversa em *pool* de soro bovino. A partir destes estudos foi desenvolvido um teste rápido e efetivo para triagem de rebanho com animais PI (Weinstock *et al.* 2001).

É importante ressaltar a relevância do desenvolvimento de um protocolo operacional padrão para que este teste seja aplicável em laboratórios clínicos. A falta de padronização de métodos pode comprometer a capacidade de identificar de forma consistente os animais infectados. Em 2009, Edmonson e colaboradores avaliaram a proficiência dos atuais métodos de diagnóstico, dentre eles a RT-PCR para detecção de BVDV em bovinos infectados usando comparações intra- e interlaboratoriais. A RT-PCR apresentou o melhor resultado, juntamente com a imunohistoquímica; já o isolamento viral ficou entre os métodos que apresentaram a maior variabilidade de resultados. Devido a esta grande discordância de resultados entre os laboratórios sugere-se a necessidade de desenvolvimento de protocolos laboratoriais padronizados e testes de eficiência.

6.2. Clonagem

Os amplicons produzidos pela PCR foram eficientemente clonados em vetor pGEM-T *Easy*. A transformação resultou em cinco clones, sendo dois clones de NADL, dois de NY-1 e um de BVDV-2 SV253 (Figura 6).

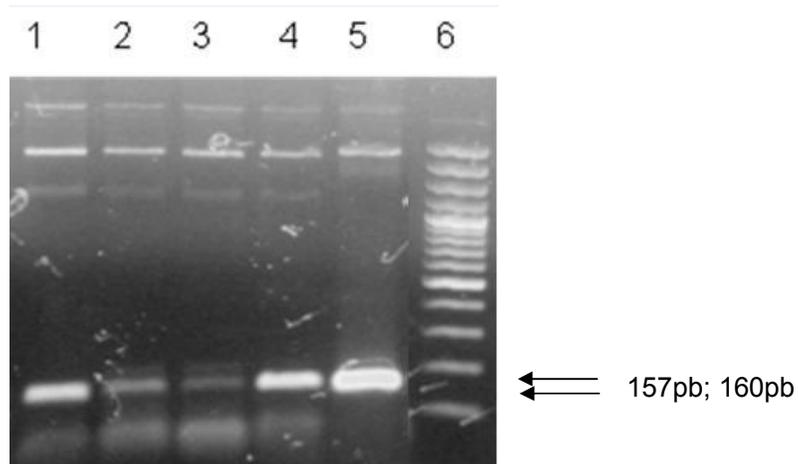


Figura 6. PCR das amostras padrões clonadas em vetor PGEMT *easy*. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Canaletas: 1: NADL clone 2; 2: NADL clone 3; 3: NY-1 clone 5; 4: NY-1 clone 6; 5: BVDV-2 SV 253 clone 7; 6: controle mix; 7: padrão de tamanho molecular (*Ladder* 100pb)

6.3. Digestão enzimática

A presença do inserto no vetor pGEM T *easy* foi também confirmada pela reação de digestão, utilizando a enzima *EcoRI* (Promega). A figura 7 é representativa da digestão enzimática.

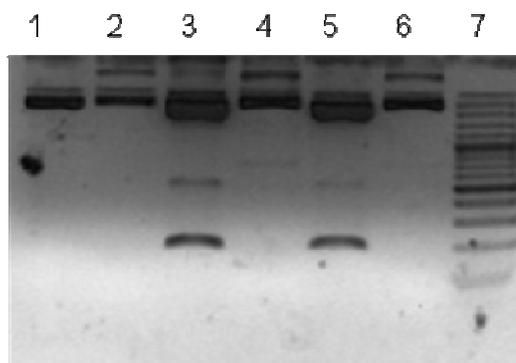


Figura 7. Digestão enzimática dos clones de BVDV-2 /pGEM T *easy*, utilizando enzima de restrição *EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Canaletas ímpares: restringido; Canaletas pares: não restringido. Canaletas 1 e 2: NADL; Canaletas 3 a 6: BVDV-2; canaleta 7: padrão de tamanho molecular (*Ladder* 100pb)

6.4. Sequenciamento

Na figura 8 é mostrada a análise de inserção da região gênica de interesse ao vetor pGEM T easy, o clone de BVDV-2 foi seqüenciado no sentido senso e anti-senso (Figura 8). Deste modo, utilizando o programa *Multalin* verificou-se que o clone produzido apresenta similaridade com as amostras alinhadas, AY-149216 BVDV-2 e U18059 BVDV-2, diferindo em 22 e 25 aminoácidos, respectivamente (Figura 8).

Além disso, diferentes análises foram realizadas para a verificação da similaridade do clone pGEM-T *easy*/BVDV-2 produzido com outras sequências de BVDV-1 (acesso no *GenBank* M31182 e FJ387232). Logo, foi observado que há 9 diferentes aminoácidos entre a amostra BVDV-1 NADL M31182 e o clone pGEM-T *easy*/BVDV-2, apresentando uma alta similaridade. Entretanto, análises de similaridade com a amostra BVDV-1 NY FJ387232 e o clone pGEM-T *easy*/BVDV-2 demonstrou uma diferença de 91 aminoácidos, ou seja, baixa similaridade (Figura 9).

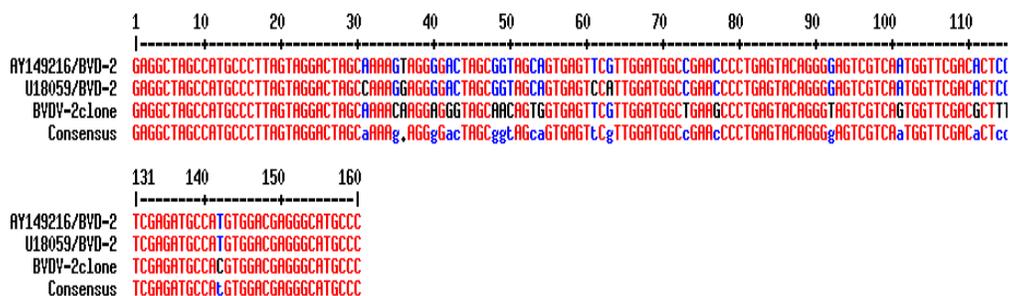


Figura 8. Análise da similaridade do clone pGEM-T *easy*/BVDV-2 com diferentes amostras de BVDV-2, depositadas no *GenBank*. sequência

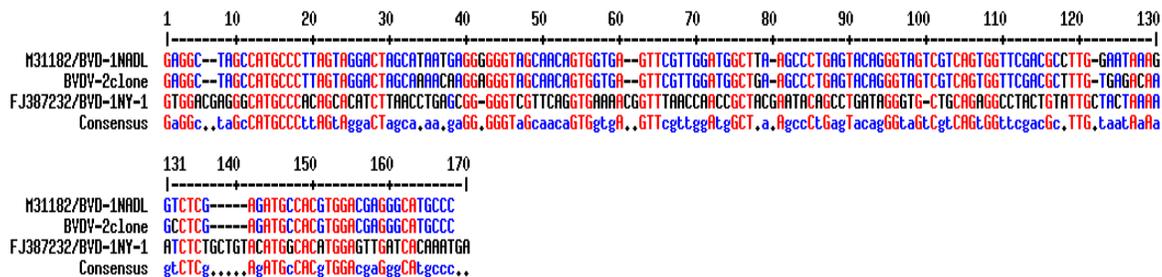


Figura 9. Análise da similaridade do clone pGEM-T *easy*/BVDV-2 com diferentes amostras de BVDV-1 (NADL e NY-1), depositadas no *GenBank*.sequência

6.5. Teste de sensibilidade analítica da PCR

Na PCR das amostras de sêmen que foram infectadas artificialmente com a amostra padrão NADL pode-se notar que houve o aparecimento da banda de tamanho molecular específica (157pb) para o vírus até a diluição decimal de 10^{-3} ou com a concentração de 45ng/ μ L de RNA (Figura 10).

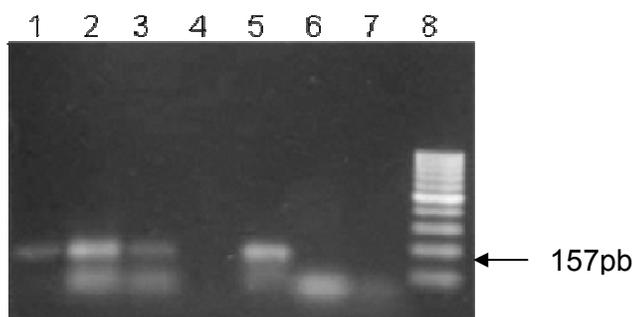


Figura 10. Sensibilidade analítica da PCR desenvolvida a partir de sêmen inoculado experimentalmente com o vírus BVDV-1 amostra NADL- Eletroforese em gel de agarose 1,2% Canaletas 1 a 8: canaleta 1: 10^{-1} , 2: 10^{-2} , 3: 10^{-3} , 4: 10^{-4} , 5: controle positivo NADL 3ª passagem em MDBK, 6: controle negativo sêmen, 7: controle de mix, 8: padrão de tamanho molecular (Ladder 100pb).

Ao realizar um estudo similar a este, testando vários pares de iniciadores para diferentes regiões de uma linhagem padrão de NADL, Hertig e colaboradores mostraram, empregando a técnica de RT-PCR, que a mesma alcançou um limite detectável de 10^{-1} a 10^{-2} . Ao utilizar o método de Sourthen Blot, o limite de detecção foi superior, 10^{-2} a 10^{-4} . Os resultados encontrados

por Hertig *et al.* corroboram com os achados neste trabalho e confirmam que a sensibilidade analítica deste método é relevante para fins de diagnóstico, bem como para estudos sobre a epidemiologia da infecção pelo vírus da BVDV (Hertig *et al.*, 1991).

Em relação aos clones BVDV-1 - NADL, BVDV-1 - NY-1 e BVDV-2 SV253, o limiar de detecção foi de 15 ag, 15 pg e 1,5 ag, respectivamente (Figura 11, 12, 13). Este teste comprova a alta sensibilidade analítica da PCR desenvolvida.

Pilz *et al.* realizaram um estudo comparando diferentes protocolos para a detecção do vírus da Diarréia viral bovina usando RT-PCR e duas amostras clínicas de sangue total e soro. Os resultados demonstraram que ambas as amostras artificialmente contaminadas com a amostra NADL do BVDV, apresentaram resultados positivos até a diluição 1:160 enquanto que em amostras de sangue total foi possível detectar positividade somente até a diluição de 1:20 (Pilz *et al.*, 2005).

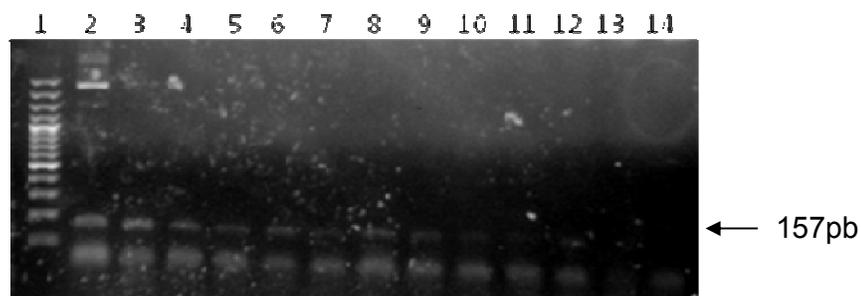


Figura 11. Sensibilidade analítica da PCR utilizando como molde clone plasmidial do vírus BVDV-1 amostra NADL- Eletroforese em gel de agarose 1,5% Canaleta 1: padrão de tamanho molecular (*Ladder* 100pb).canaleta 2 150ng, canaleta 3: 15ng, canaleta 4: 1,5ng, canaleta 5: 150pg, canaleta 6: 15pg, canaleta 7: 1,5pg, canaleta 8: 150fg, canaleta 9: 15fg, canaleta 10: 1,5fg, canaleta 11: 150ag, canaleta 12: 15ag, canaleta 13: 1,5ag, canaleta 14: controle mix.

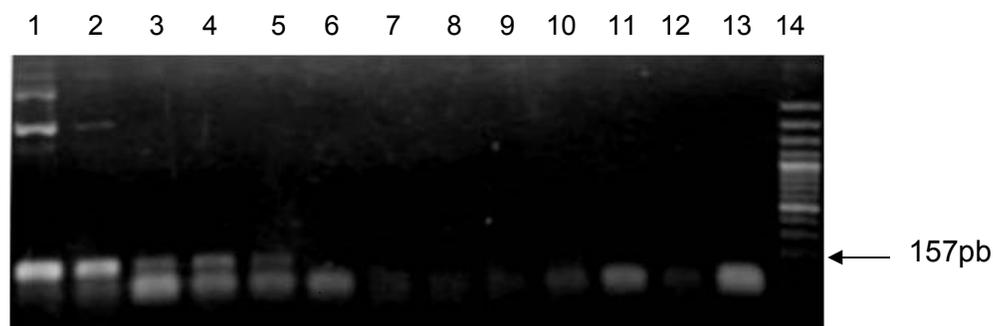


Figura 12. Sensibilidade analítica da PCR utilizando como molde clone plasmidial do vírus BVDV I amostra NY-1- Eletroforese em gel de agarose 1,5% Canaleta 1 a 14: canaleta 1 150ng, canaleta 2: 15ng, canaleta 3: 1,5ng, canaleta 4: 150pg, canaleta 5: 15pg, canaleta 6: 1,5pg, canaleta 7: 150fg, canaleta 8: 15fg, canaleta 9: 1,5 fg, canaleta 10: 150ag, canaleta 11: 15ag, canaleta 12: 1,5ag, canaleta 13: controle mix canaleta 14: padrão de tamanho molecular (*Ladder* 100pb)

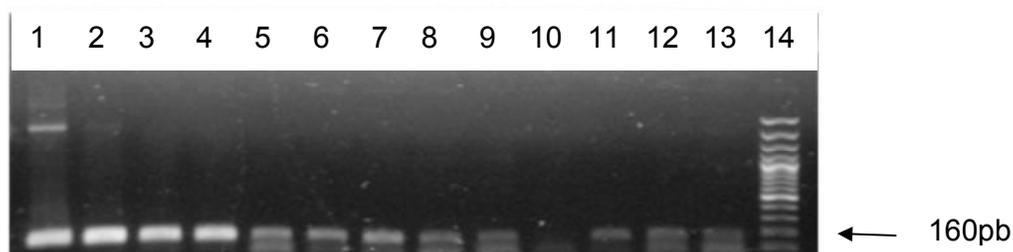


Figura 13. Sensibilidade analítica da PCR utilizando como molde clone plasmidial do vírus BVDV-2 amostra SV253- Eletroforese em gel de agarose 1,5% Canaleta 1 a 14: canaleta 1 150ng, canaleta 2: 15ng, canaleta 3: 1,5ng, canaleta 4: 150pg, canaleta 5: 15pg, canaleta 6: 1,5pg, canaleta 7: 150fg, canaleta 8: 15fg, canaleta 9: 1,5fg, canaleta 10: 150ag, canaleta 11: 15ag, canaleta 12: 1,5ag, canaleta 13: controle mix canaleta 14: padrão de tamanho molecular (*Ladder* 100pb)

Na triagem de amostras clínicas de campo para o BVDV, bem como para outros agentes virais, sempre ocorrerão diferenças como tempo de infecção e quantidade de vírus produzida, tipo de amostra clínica e seus inibidores de PCR e qualidade de coleta e tempo de estocagem. O teste aqui desenvolvido será agora aplicado em uma nova testagem de amostras clínicas e seu desempenho será reavaliado.

7. Conclusão

O ensaio mostrou-se sensível na detecção de amostras de biotipos citopagênicos (NADL) e não citopatogênicos (NY-1 e SV253) do BVDV, bem como, de BVDV-1 e BVDV-2. Além das amostras detectadas diretamente a partir de RNA extraído de cultivos celulares, o teste foi eficiente em amplificar a região escolhida após inoculação experimental de sêmen bovino, podendo ser uma ferramenta adequada para a triagem de amostras clínicas.

Referências Bibliográficas

Alliance Nutrition Beef. BVDV: The Cattle Industry's Most Costly Viral Disease. Disponível em < www.admani.com/alliancebeef/images/Pls%20made.JPG > Acesso em 15 de fevereiro de 2011.

Almeida, L. L. Vírus da diarreia bovina viral: detecção e aspectos epidemiológicos. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Veterinária**, p. 97, 2010.

Anonymous, 2004. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, fifth ed. Office International des Epizooties, Paris. Disponível em <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_index.htm>

Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório de Comercialização de Sêmen. Disponível em <<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2009.pdf>>

Baker, J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, n.11, v.3, p.425-445, 1995.

Bielanski, A.; Algire, J.; Lalonde, A. *et al.* Transmission of bovine viral diarrhea virus (BVDV) via in vitro-fertilized embryos to recipients, but not to their offspring. **Theriogenology**, v.71, n. 3, p. 499-508, 2009.

Birk, A. V.; Dubovi, E. J. *et al.* Cytoplasmic vacuolization responses to cytopathic bovine viral diarrhoea virus. **Virus Res.**, v.132, n.1-2, p. 76-85, 2008.

Bolin, S. e R.; Grooms, D. L. Origination and consequences of bovine viral diarrhea virus diversity. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.20, n.1, p.51-68, 2004.

Brito, W. M. E. D.; Alfaia, B. T.; Caixeta, S. P. M. B. Prevalência da infecção pelo Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV) no Estado de Goiás, Brasil. **Revista de Patologia**. 2010.

Brownlie, J. Pathogenesis of mucosal disease and molecular aspects of bovine viral diarrhoea virus. **Vet. Microbiol.**v. 23, p.371-379, 1990.

Campos, F. S. Desenvolvimento de teste diagnóstico de PCR convencional e PCR em tempo real para o vírus da Língua Azul. **Dissertação de Mestrado**,v.1, 2010.

Canal, C. W. et al. Differentiation of classical swine fever virus from ruminant pestiviruses by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 3-4, p. 373-379, 1996.

Carter, G. R. A Concise review of veterinary virology. Ithaca NY: International **Veterinary Information Service**, 2004.

Cornish, T. E.; Van Olphen, A. L.; Cavender, J. L. *et al.* Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhoea virus. **J Vet Diagn Invest**, v.17, n.2, p.110-117, 2005.

Dias, F. C.; Alexandrino, B.; Medeiros, A. S. R. *et al.* Comparação dos testes de vírus neutralização contra os genótipos 1 e 2 do vírus da diarréia viral bovina (BVDV-1 e BVDV-2) em bovinos de rebanhos naturalmente infectados **Ciência Rural**, Santa, v.40, n.4, p.913-920, 2010.

Fevereiro, M. Aspectos gerais do vírus da Diarréia Viral dos Bovinos e Doença das Mucosas (BVDV/MD). In Pfizer Saúde Animal, **Proceedings do Simposium de Lançamento da vacina Pregsure® BVD**, p.3-5, 2008.

Flores, E. F., Weiblen, R., Flores, F. S. *et al.* A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil- histórico, situação atual e perspectivas. **Pesq Vet Bras**.v.25, n.3, p. 125-134, 2005

Fray, M.D., Paton, D.J., Alenius, S. The effects of bovine viral diarrhoea virus on cattle reproduction in relation to disease control. **Animal Reproduction Science**. 60-61, p.615-627, 2000.

Givens, M. D.; Riddell, K. P.; Zhang, Y, *et al.* Safety and efficacy of vaccination of seronegative bulls with modified-live, cytopathic bovine viral diarrhoea viruses. **Theriogenology**, v. 71, n.6, p. 975-983, 2009.

Goens, S. D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **Can. Vet. J.**, v.43, n.12, p.946-954, 2002.

Grooms, D. L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**, v.20, n.1, p.5-19, 2004.

Gunn, G. J.; Stott, A. W.; Humphry, R. W. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. **The Veterinary Journal**, v. 167, n. 2, p.143-149, 2004.

Heinz, F.X. *et al.* Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses, **Academic Press, San Diego**, p. 859–878, 2000.

Hertig, C.; Pauli, U.; Zanoni, R. *et al.* Detection of bovine viral diarrhoea (BVD) virus using the polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, v.26, n. 1-2, p. 65-76, 1991.

Hue, H. Serological analysis of a small herd sample to predict presence or absence of animals persistently infected with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in dairy herds. **Res. Vet. Sci.** v.53, p. 320–323, 1992.

Hornberg, A.; Fernandez, S. R.; Vogl, C. *et al.* Genetic diversity of pestivirus isolates in cattle from Western Austria. **Vet. Microbiol.**, v.135, n.3-4, p. 205-213, 2009.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 01 de dezembro de 2010.

Junqueira, J. R. C.; Freitas, J. C.; Alfieri, A. F. *et al.* Avaliação do desempenho reprodutivo de um rebanho bovino de corte naturalmente infectado com o BoHV-1, BVDV e *Leptospira hardjo*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 3, p. 471-480, 2006.

Kelling, C. L. Evolution of bovine viral diarrhoea virus vaccines. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.**, v.20, n.1, p.115-129, 2004.

Kirkland, P. D.; Richards, S. G.; Rothwell, J. T. *et al.* Replication of bovine viral diarrhoea virus in the bovine reproductive tract and excretion of virus in semen during acute and chronic infections. **Veterinary Record**, v.128, p.587-590, 1991.

Krey, T.; Himmelreich, A.; Heimann, M. *et al.* Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus is determined by complement control protein 1. **J Virol**, v. 80, n.8, p. 3912-3922, 2006.

Larson, R. L.; Miller, R.B.; Kleiboeker, S. B. *et al.* Economic costs associated with two testing strategies for screening feeder calves for persistent infection with bovine viral diarrhoea virus. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 226, p. 249-254, 2005.

Lindberg, A.; Houe, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) of relevance to control. **Prev Vet Med**, v.72(1-2), n. 55-73; p.215-219, 2005.

Liu, L. PCR e Primer design. Centro Interdisciplinar para pesquisas em biotecnologia. Universidade da Flórida, 2003.

Makoschey, B.; Becher, P.; Janssen, M. G. J. *et al.* Bovine viral diarrhoea virus with deletions in the 5'-nontranslated region: reduction of replication in calves and induction of protective immunity. **Vaccine**, v.22, p. 3285-3294, 2004.

Mendes, M. B. *et al.* Determinação da prevalência das principais doenças da reprodução no rebanho bovino da região de Uberaba-MG. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1, 2009.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>> Acesso em 01 de dezembro de 2010.

Noiva, R. M. G. Utilização de imunohistoquímica e AgELISA para detecção de portadores do vírus da diarréia bovina viral em bovinos de engorda. Dissertação de mestrado. **Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária**, p.1-108, 2010.

OLIGO PRIMER ANALISYS disponível para consulta em: <<http://www.oligo.net/>>

Peterhans, E.; Bachofen, C.; Stalder, H. *et al.* Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): emerging pestiviruses doomed to extinction **Vet. Res.**, p. 41-44, 2010.

Pilz, D.; Alfieri, A. F.; Alfieri, A. A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sanguíneo, artificialmente contaminados. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p. 219-228, 2005.

Pilz, D., Alfieri, A. F., Lunardi, A. *et al.* RT-PCR in pools of bovine blood serum to detect acute infection and persistently infected animals with bovine viral diarrhoea virus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.1-7, 2007.

Poletto, R.; Kreutz, L. C.; Gonzales, J. C. *et al.* Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.595-598, 2004.

Potgieter, L. N. D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In Coetzer, J. A. W.; Thomsom, N, G. R.; Tustin, R. C. **Infectious Diseases of Livestock** Editora: Oxford University Press, 2 ed., v. 2, 2004.

Quincozes, C. G. *et al.* Prevalência e fatores associados à infecção pelo vírus da diarréia viral bovina na região Sul do Rio Grande do Sul. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 269-276, 2007.

Reed R.H.; Muench H.. A single method of estimating fifty percent end points. **American Journal of Hygiene**. v.27, p.493-497, 1938.

Ridpath, J. F. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Global Status**. Encyclopedia of virology, vol. 1. p.105-121, 2010.

Rikula, U., Nuotio, L., Laamanen, U. I. *et al.*. Transmission of bovine viral diarrhoea virus through the semen of acutely infected bulls under fields condition. **Vet. Res.**, v.162, n.3, p. 79-82, 2008.

Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Hinchcliff, K. W. *et al.* **Veterinary Medicine- A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**, 10^a ed., Filadélfia: Saunders Elsevier, 2007.

Rocca, L; Sandvik, T. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle **Journal of Virological Methods**, v. 161, p.122–127, 2009.

Rhodes, S.G., Cocksedge, J. M., Collins, R. A. Morrison, W. I. Differential cytokine responses of CD4+ and CD8+ T cells in response to bovine viral diarrhoea virus in cattle. **J. Ge. Virol.**, v.80, p. 1673-1679, p. 1999.

Saliki, J. T. e Dubovi, E. J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.**,v. 20, n.1, p. 69-83, 2004.

Sandvik, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Vet Microbiol.**, v.64, n.2-3, p.123-134, 1999.

Sambrook J, Maccallum P, Russel D (2001). **Molecular cloning: A laboratory manual**, 3rd ed. Cold Springs Harbour Press, NY, ISBN 0-87969-577-3,

Sandvik, T. Progress of control and prevention programs for bovine viral diarrhoea virus in Europe. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.**, v. 20, n.1, p.151-169, 2004.

Sandvik, T. Selection and use of laboratory diagnostic assays in BVD control programmes. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, n. 1-2, p. 3-16, 2005.

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

Serra, C. V. Desenvolvimento de um teste sorológico alternativo para a detecção de anticorpos anti-BVDV em rebanhos bovinos utilizando a citometria de fluxo. Projeto de mestrado. **Universidade Federal de Minas Gerais**, p.33, 2002.

Smirnova, N. P.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Van Campen, H. *et al.* Acute non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus infection induces pronounced type I interferon response in pregnant cows and fetuses. **Virus Res.**, v. 132, n. 1-2, p. 49-58, 2008.

Smith, D. R.; Grotelueschen, D. M. Biosecurity and biocontainment of bovine viral diarrhoea virus. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.**, v.20, n.1, p.131-149, 2004.

Stott, A.W.; Humphry, R.W.; Gunn, G.J., 2009. Modelling the effects of previous infection and re-infection on the costs of bovine viral diarrhoea outbreaks in beef herds. **The Veterinary Journal**, v.185, p. 138–143.

Thompson, J. A. *et al.* Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil **Preventive Veterinary Medicine**, v. 76, n. 3-4, p. 17, p. 290-301, 2006.

Vidor, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no Rio Grande do Sul. **Bolm. Inst. Pesq. Vet. Des.** v.5, n.51, p.51-58, 1974.

Viet, A. F.; Krebs, S. Bovine viral diarrhoea virus: Economic evaluation of outbreaks by modelling, **The Veterinary Journal**, v.185, p.103–104, 2010.

Vilcek, S.; Durkovic, B.; Kolesarova, M.*et al.* Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. **Prev. Vet. Med.**, v.72(1-2), n. 31-35,p. 215-219, 2005.

Vilcek, S.; Urkovi, B.; Kolesárová, M. *et al.* Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. **Vet. Res.**, n. 35, p. 609–615, 2004.

Xue, W., Zhang, S., Minocha, H. **Characterization of a putative receptor protein for bovine viral diarrhoea virus.** *Vet. Microbiol.*v. 51, p. 105-118, 1997.

Xue, F.; Zhu, Y. .M.; Li, J, *et al.* Genotyping of bovine viral diarrhoea viruses from cattle in China between 2005 and 2008. **Vet. Microbiol.**,2008.