

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA

**Desenvolvimento de PCR convencional e em
tempo real para o Vírus da Língua Azul**

Fábia Souza Campos

Belo Horizonte
2010

Fábia Souza Campos

**Desenvolvimento de PCR convencional e em
tempo real para o Vírus da Língua Azul**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Dra. Zélia Inês Portela Lobato

Co-Orientadora: Dra. Edel Figueiredo Barbosa
Stancioli

Belo Horizonte

Escola de Veterinária – UFMG

2010

Campos, Fábria Souza
C186d Desenvolvimento de teste diagnóstico de PCR convencional e PCR em tempo real
para vírus da língua azul / Fábria Souza Campos. – 2010.
63 p. : il.

Orientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Co-orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

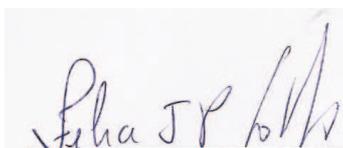
Tese (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

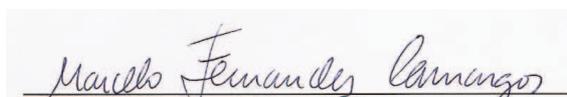
1. Vírus língua azul – Doenças – Teses. 2. Doenças transmissíveis em animais –
Teses. 3. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Lobato, Zélia Inês Portela.
II. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.089 601 94

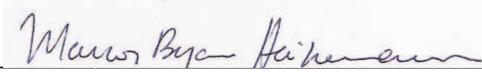
Dissertação defendida e aprovada em 05 de Novembro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída por:



Profa. Dr.^a. Zélia Inês Portela Lobato



Dr.^o. Marcelo Fernandes Carmagos



Profo. Dr.^o. Prof. Marcos Bryan Heinemann

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó
Zenith e a minha mãe Gláucia.

*“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos,
há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam,
mas há pessoas que simplesmente aparecem em
nossas vidas e nos marcam para sempre”*

Cecília Meireles

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Profa. Zélia e Profa. Edel, por acreditarem em mim, por todos esses anos de orientação, conhecimentos, incentivos, confiança, carinho, dedicação, amizade e por me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissionais e de mulheres as quais sempre farão parte da minha vida, desta cabeça dura, mas que ama muito as senhoras.

À querida Profa. Zélia que sabe aceitar os altos e baixos que acontecem no dia-a-dia com companheirismo, com discrição e bastante prudência. Está sempre por dentro de tudo, discutindo e argumentando sobre os mais diversos assuntos. Responsabilidade e dedicação são marcantes em sua vida. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa esta dissertação e por me deixar conviver com sua família: Lorena, Rafael, Tiago, Prof^o. Francisco, Sr. Odilon e Sra. Benita. Agradeço de coração.

À querida Profa. Edel que consegue transmitir confiança, bem-estar, lucidez... Acolheu-me em seu laboratório com tanta generosidade, respeito e carinho. E a quem eu devo meu conhecimento e gosto pela pesquisa científica “pesquisa não é fácil”; “biologia não é matemática”. Os tantos e inesquecíveis diálogos, entendendo meus anseios, como o imenso carinho e amor nos momentos de dificuldade e de dor. Serei eternamente grata.

À profa. Beth que me proporcionou a oportunidade de trabalhar com pesquisa, me integrando ao Laboratório e ainda tive a sorte de conhecer a Profa. Zélia. Obrigada pela confiança depositada em mim e pelo seu apoio.

A meus pais e avós que são meus exemplos de amor, fé, caráter, esperança, dignidade e mesmo sem compreender meus motivos sempre me apoiaram. Um agradecimento especial a minha mãe Gláucia pelo amor incondicional e a madrinha vovó Zenith minha heroína.

Meus tios e tias pelo afeto inestimável e por colocar na minha vida meus primos maravilhosos. Amo muito vocês!

A minha irmã Sybelle que nos deu um grande presente, meu amado e lindo sobrinho Guilherme, Meu Pequeno Príncipe.

Meu afilhado preferido, Caio Magno, pela constante ajuda. Você é meu orgulho!

À Janice pela ajuda na elaboração do projeto e principalmente agora na fase final desta dissertação. Muito obrigada.

A todos do laboratório Labmic que foi minha segunda casa, tornamo-nos amigos e companheiros durante toda a caminhada, por isso merecem um agradecimento especial.

À Profa. Fátima pelo respeito, pela confiança e por me aceitar no seu laboratório juntamente com a Profa. Edel.

Às meninas do Prof. Andrey, em especial a Telma, Gio Ivo, Monalisa, Juliana, Jordana, Elaine e Ana Paula, por promoverem momentos divertidos e descontraídos tornando os trabalhos menos desgastantes.

Ao laboratório da Profa. Zélia, principalmente a Tíntia, Ju Fonte Boa, Marieta, Izabelle, Bel, Carol, Tércia, Amanda, Alessandra, Iarina, Profa. Beth. Sentirei saudades.

Ao laboratório do Prof^o. Francisco, principalmente ao Felipinho, amigo e companheiro durante todos estes anos.

À Tíntia, amiga de todas as horas, pela sensibilidade, estímulo, convívio prazeroso que me ajudaram muito. Sinto muito a sua falta.

Aos técnicos e funcionários da escola de veterinária, especialmente a Cassinha, Doracy, Eduardo, Mirli, Nádia, Grazielle e Renata pela valiosa ajuda.

Aos companheiros do café: Eduardo, Mirli, Nelson, Renata e Prof^o. Nelson pela nossa alegre e tranquila convivência.

Aos professores Lobão e Último, verdadeiros Professores Médicos Veterinários, que foram responsáveis pelas amostras de campo que contribuíram muito para a realização do nosso trabalho.

Ao Prof^o Marcos, agradeço as sugestões a esse trabalho, por fazer parte da seleção de mestrado, avaliando o meu projeto e agora como membro da comissão avaliadora desta dissertação.

À família Magalhães: todos os professores, direção, equipe pedagógica, secretárias, serviços e alunos da Escola Estadual Professora Maria de Magalhães Pinto pelo carinho, auxílio, apoio que sempre me deram.

E finalmente a Deus, por sempre me iluminar e me guiar, proteger e por colocar estas pessoas aqui citadas e outras que não mencionei no meu caminho. Muito obrigada!

RESUMO

A Língua Azul (LA) é uma doença infecciosa não contagiosa que apresenta importantes impactos sócio-econômicos decorrentes de restrições na importação e ou por perdas diretas nos rebanhos infectados com o vírus da língua azul (BTV). O BTV é um membro da família *Reoviridae*, gênero *Orbivirus*, transmitido por um vetor artrópode do gênero *Culicoides*. O BTV pode afetar ruminantes domésticos e selvagens, porém a doença clínica é grave especialmente em ovinos e algumas espécies de cervos. Até o momento, 24 sorotipos são descritos na literatura. O BTV é endêmico em várias partes do mundo, incluindo a África e regiões dos EUA, Austrália e Ásia. Este trabalho teve como objetivo padronizar a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real para a detecção do BTV. Após extração do RNA foi realizada transcrição reversa seguida de uma PCR convencional e em tempo real utilizando iniciadores específicos para o gene que codifica a proteína não estrutural NS3 do BTV, produzindo um fragmento de 256pb. Os testes padronizados foram realizados com amostras de sangue e sêmen de bovinos infectados experimentalmente com BTV-4. Os resultados demonstraram que houve a amplificação do fragmento de tamanho esperado (256pb), validando, assim, o protocolo desenvolvido para PCR convencional e PCR em tempo real. A partir da técnica de PCR convencional foi detectado uma sensibilidade analítica de 30 fg, utilizando-se cDNA da suspensão do BTV-4, e de 250 ag de ácido nucléico (10^{-18} ag), utilizando-se o DNA plasmidial como molde. Os resultados da PCR em tempo real, de acordo com a curva padrão, apresentaram coeficiente de determinação (R^2) em torno de 0,998 e *slope* de -3,528, revelando uma eficiência de amplificação de aproximadamente 92%, mostrando-se confiável para a detecção do BTV. A PCR convencional e a PCR em tempo real também foram testadas em amostras de sangue de bovinos, caprinos e ovinos provenientes de uma propriedade de MG, com suspeita de doença erosiva. Todos os ensaios aqui apresentados apontaram que a PCR em tempo real foi capaz de detectar o BTV com uma sensibilidade e especificidade satisfatória podendo ser usada nas amostras experimentalmente e naturalmente infectadas.

Palavras chave: Língua Azul. Diagnóstico do Vírus da Língua Azul. PCR convencional. PCR em Tempo Real.

ABSTRACT

The Bluetongue (BT) is a non-contagious infectious disease that has important socio-economic impacts of restrictions on import and / or by direct losses in cattle infected with bluetongue virus (BTV). The BTV is a member of the family *Reoviridae*, genus *Orbivirus*, transmitted by an arthropod vector of the genus *Culicoides*. The BTV can affect domestic and wild ruminants, but clinical disease is especially severe in sheep and some species of deer. To date, 24 serotypes are reported. The BTV is endemic in many parts of the world, including Africa and parts of the U.S., Australia and Asia. This study aimed to standardize the technique of polymerase chain reaction (PCR) and conventional real-time detection of BTV. After RNA extraction was performed followed by a reverse transcription PCR and real-time using specific primers for the gene that encodes the nonstructural protein NS3 of BTV, producing a fragment of 256pb. Standardized tests have been performed with semen and blood samples from cattle experimentally infected with BTV-4. The results showed amplification of the fragment of expected size (256pb), validating thus the protocol developed for conventional PCR and real-time PCR. From the conventional PCR detected an analytical sensitivity of 30fg, using cDNA of the suspension of BTV-4 and 250 g of nucleic acid (10-18ag), using plasmid DNA as template. The PCR results in real time, according to the standard curve, determination coefficients (R²) around 0.998 and slope of -3.528, indicating an amplification efficiency of about 92%, being reliable for the detection of BTV. The conventional PCR and real-time PCR were also tested on blood samples of cattle, goats and sheep from a property of MG with suspected erosive disease. All tests here have pointed out that the real-time PCR was able to detect BTV with a satisfactory sensitivity and specificity can be used in experimentally and naturally infected samples. The PCR showed a lower sensitivity in detecting the virus in field sample.

Keywords: Bluetongue. Diagnosis of Bluetongue Virus. Conventional PCR. Real-Time PCR.