



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**ESCOLA DE VETERINÁRIA**

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

**Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de  
sêmen bovino para *Bovine viral diarrhea virus* e  
*Bluetongue virus* utilizando RT-PCR convencional e  
em tempo real (qRT-PCR).**

**Marcela Ribeiro Gasparini**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária-UFMG  
2014**



**Marcela Ribeiro Gasparini**

**Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de sêmen bovino para *Bovine viral diarrhea virus* e *Bluetongue virus* utilizando RT-PCR convencional e em tempo real (qRT-PCR).**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Co-orientadores: Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite e Prof. Dr. Peter Paul Clement Mertens.

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária-UFMG  
2014**

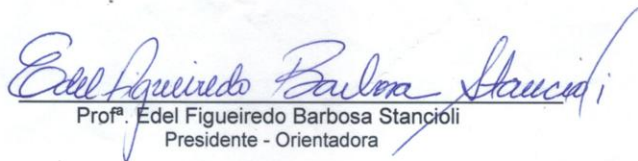
G249d Gasparini, Marcela Ribeiro, 1983-  
Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de sêmen bovino para *Bovine viral diarrhoea virus* e *Bluetongue virus* utilizando RT-PCR convencional e em tempo real (qRT-PCR) / Marcela Ribeiro Gasparini. – 2014.  
125 p. : il.

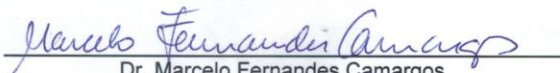
Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli  
Co-orientadores: Rômulo Cerqueira Leite, Peter Paul Clement Mertens  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

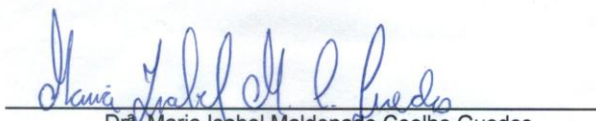
1. Bovino – Doenças - Diagnóstico – Teses. 2. Sêmen – Análise – Teses. 3. Vírus da diarreia em bovinos – Teses. 4. Vírus da língua azul – Teses. 5. Reação em cadeia de polimerase – Teses. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. II. Leite, Rômulo Cerqueira. III. Mertens, Peter Paul Clement. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 969 2

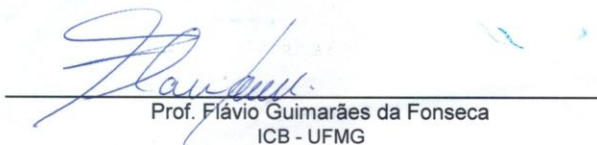
Tese defendida e aprovada em 26 de março de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

  
Prof.<sup>a</sup> Edel Figueiredo Barbosa Stancioli  
Presidente - Orientadora

  
Dr. Marcelo Fernandes Camargos  
LANAGRO

  
Dr.<sup>a</sup> Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes  
Pós-Doutoranda EV - UFMG

  
Prof.<sup>a</sup> Zélia Inês Portela Lobato  
Escola de Veterinária - UFMG

  
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
ICB - UFMG

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rômulo Cerqueira Leite que me recebeu em seu laboratório, pelo incentivo a pesquisa, pela orientação e confiança.

A Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli pela amizade e orientação durante o projeto e pela presença nos momentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Peter Mertens por ter me oferecido a grande oportunidade de trabalhar no laboratório sob sua coordenação no The Pirbright Institute – UK. Foi maravilhoso tanto para a minha vida pessoal quanto profissional. À Dra. Kyriaki Nomikou que me treinou diretamente nos trabalhos diários em Pirbright, por sua colaboração e amizade.

À Iracema pela colaboração, disposição e amizade durante todo tempo.

Aos amigos da pós-graduação pela amizade e companheirismo.

Aos companheiros de trabalho Mateus, Aline e Amanda presentes em todos os momentos de apuro ou de alegria, pela dedicação e carinho.

Aos colegas do LVBA Camila, Bárbara, Fabiana, Lorena, Jaqueline, Tânia, Leandro, Luis, Daniele, Vinícius, Thiago, Alice, Juliana, Lorena Ribeiro, Fernando e Rodrigo.

Ao Prof. Dr. Jenner e aos companheiros do RETROLAB, André, Paula, Cairo, Fernanda, Daniel, João, Gissandra, Erika e Dani pela amizade. Agradecimentos especiais a Graciela e ao Bruno, por me ajudar em muitos experimentos.

À minha irmã Bruna e ao meu cunhado Fábio pela compreensão, amizade e pela ajuda em todos os momentos.

Ao meu marido Luís Henrique pela compreensão, colaboração, paciência e pelo carinho durante todo processo.

Aos meus cunhados, Rafael, Cyntia e Ana Cláudia pelo apoio.

Ao meu sogro e minha sogra, Roberto e Mirna, que estão presentes e incentivando sempre.

Aos meus pais Edimar e Mauro pela confiança e motivação em todos os momentos da minha vida.

Às instituições fomentadoras que financiaram este trabalho e minha bolsa no país e no exterior, CNPq e CAPES.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

### **Epígrafe**

“Quem já passou por essa vida e não viveu,  
pode ser mais, mas sabe menos do que eu,  
porque a vida só se dá para quem se deu.....”

Vinícius de Moraes

Sumário	Pág.
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1 <i>Bovine viral diarrhoea virus</i></b>	<b>19</b>
<b>1 Revisão</b>	<b>21</b>
1.1 Introdução	21
1.2 Etiologia	21
1.3 Histórico	22
1.4 Multiplicação viral	22
1.5 Epidemiologia	23
1.6 Transmissão	23
1.7 Patogenia	24
1.8 Animais persistentemente infectados (PI)	24
1.9 Doença das mucosas	24
1.10 Diagnóstico	25
1.11 Controle	25
<b>2 Material e Métodos</b>	
2.1 Multiplicação e titulação viral	26
2.2 Extração de RNA	27
2.3 Iniciadores e otimização da RT-PCR	27
2.4 Clonagem plasmidial	29
2.5 Transformação bacteriana	29
2.6 Extração plasmidial em pequena escala	30
2.7 Contaminação experimental de amostras de sêmen	30
2.8 qRT-PCR	30
2.9 Sensibilidade analítica	31
2.10 Especificidade analítica	31
2.11 Sequenciamento	31
<b>3 Resultados e discussão</b>	
3.1 Multiplicação e titulação virais	32
3.2 Sensibilidade analítica	32
3.3 Sequenciamento	35
3.4 qRT-PCR	36
3.5 Repetibilidade e Reprodutibilidade	39
3.6 Especificidade	41
<b>4 Referências Bibliográficas</b>	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO 2 <i>Bluetongue virus</i></b>	<b>48</b>
<b>1 Revisão</b>	<b>50</b>
1.1 Introdução	50
1.2 Etiologia	50
1.3 Histórico	51
1.4 Transmissão	51
1.5 Patogenia	52



1.6 Diagnóstico	53
1.7 Controle	53
<b>2 Material e Métodos</b>	
2.1 Vírus referência e titulação viral	54
2.2 Extração do RNA viral	55
2.3 Iniciadores e otimização da RT-PCR	55
2.4 Clonagem plasmidial	56
2.5 Transformação bacteriana	57
2.6 Extração plasmidial em pequena escala	57
2.7 Contaminação experimental de amostras de sêmen	57
2.8 qRT-PCR	58
2.9 Sensibilidade analítica	58
2.10 Sequenciamento	58
<b>3 Resultados e discussão</b>	
3.1 Titulação viral	59
3.2 Sensibilidade analítica	59
3.3 Sequenciamento	61
3.4 qRT-PCR	62
3.5 Repetibilidade e Reprodutibilidade	65
<b>4 Referências Bibliográficas</b>	67
<b>CAPÍTULO 3 BVDV e BTV EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS</b>	<b>75</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>77</b>
<b>2 Metodologia desenvolvida no Brasil</b>	
2.1 Coleta de sêmen	78
2.2 Extração de RNA	79
2.3 RT-PCR	79
2.4 qRT-PCR	80
2.5 Análise estatística	80
2.6 Sequenciamento	80
<b>3 Metodologia desenvolvida no Instituto Pirbright (<i>The Pirbright Institute</i> - UK)</b>	<b>81</b>
3.1 Extração de RNA viral	82
3.1.1 Uso do TRIzol para extração de RNA de amostras virais em cultivo celular	82
3.1.2 Uso do TRIzol LS para extração de RNA de amostras virais no sêmen	83
3.1.3 Extração de RNA com o <i>QIAamp Viral RNA Mini Kit</i>	83
3.1.4 Extração de RNA robótica utilizando o <i>KingFisher</i>	83
3.2 Diagnóstico de BTV em amostras de sêmen utilizando qRT-PCR e o seg-10 (NS3)	84
3.3 Diagnóstico de BTV em amostras cultivadas em célula utilizando qRT-PCR e o segmento 9 (VP6)	85
3.4 qRT-PCR para tipagem de BTV	85
3.5 Sequenciamento	85
3.5.1 PCR	85

3.5.2 Purificação do produto de PCR	86
3.5.2.1 Purificação direta do produto de PCR	86
3.5.2.2 Gel de agarose	86
3.5.3 Reação de sequenciamento	87
3.6 Isolamento de BTV em cultivo celular	88
3.6.1 Células KC	88
3.6.2 Células BHK-21	89
3.6.3 Célula VERO	89
<b>4 Resultados e discussão dos resultados desenvolvidos no Brasil</b>	
4.1 RT-PCR <i>one-step</i>	90
4.2 qRT-PCR <i>one-step</i>	90
4.3 RT-PCR X qRT-PCR análise de concordância	91
4.4 Sequenciamento e Inferência filogenética	92
<b>5 Resultados e discussão dos resultados desenvolvidos em Pirbright</b>	
5.1 Extração de RNA viral das amostras de referência	96
5.2 qRT-PCR para tipagem de BTV	97
5.3 Isolamento viral	101
5.4 qRT-PCR dos isolados de sêmen	103
5.5 RT-PCR e Análise filogenética	104
<b>6 Referências Bibliográficas</b>	114
<b>CONCLUSÕES</b>	115
<b>ANEXOS</b>	
Anexo 1 Tabela com as amostras de sêmen e resultados da RT-PCR e qRT-PCR para BTV	116
Anexo 2 Tabela com as amostras de sêmen e resultados da RT-PCR e qRT-PCR para BVDV	118
Anexo 3 Tabela resultados sensibilidade analítica BVDV e BTV	119
Anexo 4 Documentos de envio de amostras seminais para UK	120
Anexo 5 Documento de notificação da positividade de BTV em amostras de sêmen	125

<b>Lista de figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>CAPÍTULO 1 <i>Bovine viral diarrhoea virus</i></b>	
Figura 1.1: Sensibilidade analítica da RT-PCR desenvolvida (região 5'-UTR) utilizando o <i>Kit Access Quick</i> (Promega), para o vírus BVDV-1 – amostra NADL em cultivo celular e amostra de sêmen contaminada experimentalmente.	<b>33</b>
Figura 1.2: Sensibilidade analítica da RT-PCR desenvolvida (região 5'-UTR), utilizando transcrição reversa com o kit <i>Improm II</i> (Promega), seguido de PCR utilizando a enzima <i>Go taq</i> (Promega), para o vírus BVDV-1 – amostra NADL em cultivo celular e amostra de sêmen contaminada experimentalmente.	<b>34</b>
Figura 1.3: Sensibilidade analítica da PCR para BVDV (região 5'-UTR) utilizando plasmídeo como molde.	<b>35</b>
Figura 1.4: Alinhamento das sequências da região 5'-UTR amplificadas a partir do vírus BVDV-1 amostra NADL.	<b>35</b>
Figura 1.5: Análise da sensibilidade da qRT-PCR para BVDV (5'-UTR).	<b>38</b>
Figura 1.6: Teste de especificidade da RT-PCR para BVDV utilizando a região não codificadora 5'(5'-UTR).	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 2 <i>Bluetongue virus</i></b>	
Figura 2.1: Sensibilidade analítica da RT-PCR <i>one-step</i> para BTV (região codificadora da NS3) para vírus em cultivo celular e amostras de sêmen contaminado experimentalmente utilizando o <i>Kit Access Quick</i> (Promega).	<b>59</b>
Figura 2.2: Sensibilidade analítica da RT-PCR <i>two-step</i> para BTV (região codificadora da NS3) para vírus em cultivo celular e amostras de sêmen contaminado experimentalmente utilizando kit <i>Improm II</i> (Promega), seguido de RT-PCR utilizando <i>go taq</i> (Promega).	<b>60</b>
Figura 2.3: Sensibilidade analítica da PCR para BTV (região NS3).	<b>61</b>
Figura 2.4: Especificidade do amplicon de BTV verificada por sequenciamento.	<b>62</b>
Figura 2.5: Análise da sensibilidade da qRT-PCR para BTV <i>one-step</i> (NS3).	<b>64</b>
<b>CAPÍTULO 3 BVDV e BTV EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS</b>	
Figura 3.1: Mapa das mesorregiões do Estado de Minas Gerais.	<b>78</b>
Figura 3.2: Análise filogenética de BVDV com sequências amplificadas por RT-PCR e sequenciadas à partir de amostras de sêmen de animais naturalmente infectados.	<b>94</b>
	<b>10</b>

Figura 3.3: Análise filogenética de BTV com sequências amplificadas por RT-PCR e sequenciadas à partir de amostras de sêmen de animais naturalmente infectados.	<b>95</b>
Figura 3.4: RNA dos 25 tipos de BTV extraído pelo método TRIzol.	<b>96</b>
Figura 3.5: Curva teste de amplificação de BTV (seg-10) por qRT-PCR, a partir de amostras de sêmen.	<b>98</b>
Figura 3.6: Curva de amplificação de BTV-4 e BTV-12 (seg-2) por qRT-PCR, a partir de amostras de sêmen.	<b>99</b>
Figura 3.7: Curva de amplificação de BTV-2, BTV-6, BTV-14 e BTV-17 (seg-2) por qRT-PCR, a partir de amostras de sêmen.	<b>100</b>
Figura 3.8: Comparação do valor do <i>Ct</i> . na qRT-PCR (seg-9) para amostras que foram cultivadas em célula de inseto (KC) e células de mamíferos BHK-21 e VERO.	<b>103</b>
Figura 3.9: RT-PCR amplificação dos seg-7, seg-8, seg-9 e seg-10.	<b>105</b>
Figura 3.10: RT-PCR para amplificação do BTV-4, BTV-7, BTV-8, BTV-10, BTV-12, BTV-16 seg-2.	<b>106</b>
Figura 3.11: RT-PCR para amplificação do BTV-4 seg-2.	<b>107</b>
Figura 3.12: RT-PCR para amplificação do BTV-16 seg-2.	<b>108</b>
Figura 3.13: Análise filogenética do seg-7 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01.	<b>109</b>
Figura 3.14: Análise filogenética do seg-9 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01.	<b>110</b>
Figura 3.15: Análise filogenética do seg-10 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01.	<b>111</b>
Figura 3.16: Análise filogenética do seg-2 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01 e das amostras de sêmen 78 e HVB01.	<b>112</b>

<b>Lista de tabelas</b>	<b>Pág.</b>
<b>CAPÍTULO 1 <i>Bovine viral diarrhoea virus</i></b>	
Tabela 1.1 Iniciadores, orientação e tamanho esperado do <i>amplicon</i> do gene 5'UTR do BVDV e do gene normalizador GAPDH.	<b>28</b>
Tabela 1.2 Relação do valor de <i>Ct</i> . na qRT-PCR com a diluição seriada da amostra padrão BVDV-1 NADL	<b>36</b>
Tabela 1.3 Coeficiente de variação (CV) de cada amostra para análises intra-ensaios e inter-ensaios.	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 2 <i>Bluetongue virus</i></b>	
Tabela 2.1 Iniciadores, orientação, localização e tamanho esperado do <i>amplicon</i> do gene que codifica a proteína não estrutural NS3 do BTV-4.	<b>55</b>
Tabela 2.2 Relação do valor de <i>Ct</i> . na qRT-PCR com a diluição seriada da amostra padrão BTV-4.	<b>62</b>
Tabela 2.3 Coeficiente de variação (CV) de cada amostra para análises intra-ensaios e inter-ensaios.	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 3 BVDV e BTV EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS</b>	
Tabela 3.1 Tabela para auxílio do cálculo do índice <i>Kappa</i> (análise estatística utilizada para concordância entre dois testes diagnósticos).	<b>81</b>
Tabela 3.2 Quantidade de DNA para sequenciamento com relação ao comprimento do produto da PCR.	<b>87</b>
Tabela 3.3 Amostras de sêmen <i>in natura</i> testadas e coinfeção para BVDV e BTV.	<b>90</b>
Tabela 3.4 Valor do <i>Ct</i> na qRT-PCR 5'UTR-BVDV em amostras de sêmen bovino.	<b>91</b>
Tabela 3.5 Valor do <i>Ct</i> na qRT-PCRNS3 (seg-10)-BTV em amostras de sêmen bovino.	<b>91</b>
Tabela 3.6 Análise dos resultados obtidos através das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR para BVDV em amostras de sêmen utilizando o índice <i>Kappa</i> .	<b>91</b>
Tabela 3.7 Análise dos resultados obtidos através das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR para BTV em amostras de sêmen utilizando o índice <i>Kappa</i> .	<b>92</b>
Tabela 3.8 Diagnóstico de BTV em amostras de sêmen utilizado qRT-PCR (seg-10).	<b>97</b>

Tabela 3.9 Amostras de sêmen positivas para BTV-4.	<b>100</b>
Tabela 3.10 Análise da citotoxicidade celular e valor de <i>Ct</i> . na qRT-PCR seg-9.	<b>102</b>
Tabela 3.11 Valor de <i>Ct</i> . na qRT-PCR para tipagem de BTV utilizando o seg-2	<b>104</b>

---

## Listra de abreviaturas

---

BHK- Células de rim de hamster neonato (do inglês, *Baby Hamster Kidney*)  
BTV- *Bluetongue virus*  
BVDV- *Bovine viral diarrhea virus*  
cDNA- DNA complementar (do inglês, *complementary DNA*)  
CP- Citopatogênica  
Ct-Limiar de detecção da Fluorescência (do inglês, *cycle Threshold*)  
DM- Doença das mucosas  
DMEM- Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)  
DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)  
dNTP- Desoxirribonucleotídeo trifosfatado (do inglês, *deoxyribonucleotide triphosphate*)  
ECP- Efeito citopático  
EDTA- Ácido etilendiaminotetracético  
ELISA- Ensaio imunoenzimático (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)  
GAPDH-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês, *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)  
GMEM- Meio Mínimo Essencial de Glasgow (do inglês, *Glasgow Minimum Essential Medium*)  
IFD- Imunofluorescência direta  
IHC- Imunohistoquímica  
KC- Células derivadas de *Culicoides Sonorensis*  
LB- Meio Luria Bertani  
MDBK- Células de rim bovino Mardin-Darby (do inglês, *Mardin-Darby Bovine Kidney*)  
NCP- Não citopatogênica  
ORF- Fase aberta de leitura (do inglês, *Open Reading Frame*)  
PBMC- Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*)  
PBS- Tampão salina-fosfato (do inglês, *Phosphate buffered*)  
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase chain reaction*)  
qRT-PCR- RT-PCR cinética ou RT-PCR em tempo real  
RNA- Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic acid*)  
RT-PCR- Transcrição reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Reverse transcription polymerase chain reaction*)  
SFB- Soro fetal bovino  
SFE- Soro fetal equino  
SDS-Dodecil sulfato de sódio (do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*)  
SN- Soroneutralização  
TBE-Tris-borato-EDTA  
TCID<sub>50</sub>- Diluição requerida de vírus para infectar 50% das células inoculadas (do inglês, *Tissue culture infectious dose 50*)  
TPB- Caldo triptose-fosfato (do inglês, *Tryptose Phosphate Broth*)  
TRIS- Tris (hidroximetil) aminometano - (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>  
VERO- Células renais de macaco verde africano adulto (do inglês, *Vero adult African green monkey cell*)  
VN- Vírus neutralização

---

---

## Desenvolvimento de testes para triagem de amostras de sêmen bovino para *Bovine viral diarrhea virus* e *Bluetongue virus* utilizando RT-PCR convencional e em tempo real (qRT-PCR)

---

### RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, e devido à importância do sêmen e sua comercialização, tornou-se necessário o desenvolvimento de testes moleculares sensíveis e específicos para o diagnóstico viral nestas amostras biológicas. O *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) e o *Bluetongue virus* (BTV) são vírus de importância na cadeia reprodutiva bovina e com o crescimento significativo da inseminação artificial e outras técnicas reprodutivas, as amostras de sêmen devem ser testadas para reduzir o risco de infecção e transmissão virais. Este projeto objetivou o desenvolvimento e otimização de testes diagnósticos para a detecção dos vírus BVDV e BTV em sêmen bovino. Para ambos os vírus foram desenvolvidos testes sensíveis e específicos, tanto na RT-PCR quanto na qRT-PCR, podendo ser utilizados no diagnóstico do BVDV e do BTV não só para amostras de sêmen, mas também para outros tipos de amostras biológicas. Após a otimização das técnicas moleculares, amostras clínicas de sêmen *in natura* provenientes de animais naturalmente infectados do estado de Minas Gerais, foram utilizadas para avaliar os testes desenvolvidos. Optou-se pela utilização da RT-PCR/qRT-PCR *one-step* (em um único passo) tanto para BVDV quanto para BTV, por terem se mostrado sensíveis e terem apresentado resultados mais precisos, além de possibilitarem o diagnóstico de um número grande de amostras com mais rapidez e com chance diminuída de contaminação laboratorial. Foram encontradas 21 (39,62%) amostras positivas para BVDV e 24 (45,28%) para BTV na RT-PCR *one-step*; e, na qRT-PCR *one-step*, 27 (50,9%) de amostras de sêmen positivas para BVDV e 32 (60,4%) para BTV. A ocorrência de coinfeção com os dois vírus foi observada em 28,3% (15) do total de amostras analisadas, sendo observada em todas as regiões amostradas. Os iniciadores utilizados para o diagnóstico de BTV nesse trabalho (NS3/seg-10) não fazem a diferenciação entre os sorotipos, por essa razão foi realizada a caracterização dos sorotipos circulantes no Brasil em um laboratório no Reino Unido (*The Pirbright Institute*, laboratório de referência da OIE em BTV). Utilizando-se o seg-2 (VP2) para testar amostras de sêmen e isolados virais, comprovou-se a circulação do BTV-4, e de maneira inédita, mostrou a circulação de BTV-8, BTV-10 e BTV-16 no Brasil. Duas amostras de sêmen foram positivas para diferentes tipos de BTV (BTV-4, BTV-8, BTV-10 e BTV-16 para uma amostra e BTV-4 e BTV-10 para outra amostra), além de ambas serem positivas também para BVDV-1. Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a alta prevalência dos vírus BVDV e BTV em amostras de sêmen bovino no Brasil isoladamente ou em coinfeção, comprovando a importância de se testar cada partida seminal produzida, e, o risco sanitário representado por uma única amostra não testada para um rebanho. Apontam ainda a necessidade de revisão das medidas de controle do sêmen bovino em nosso país.

**Palavras-chave:** RT-PCR, qRT-PCR, sêmen bovino, diagnóstico, BTV, BVDV



## ABSTRACT

Brazil has the largest commercial cattle herd in the world, and due to the importance of the semen and its trade, it has become necessary to develop sensitive and specific molecular tests for viral diagnosis in semen. The *Bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) and *Bluetongue virus* (BTV) are important viruses in bovine reproductive chain and with the significant growth of artificial insemination and other reproductive technologies, it has become important to test semen samples to reduce the risk of viral infection. This project aimed the development and optimization of diagnostic tests for the detection of BVDV and BTV virus in bovine semen. The results for both viruses were considered satisfactory in both RT-PCR and the qRT-PCR. They can be used in the diagnosis of BVDV and BTV not only in semen samples but also for other types of biological samples. After optimization of molecular techniques, clinical samples of fresh semen from naturally infected animals in the state of Minas Gerais were used to evaluate the developed tests. We opted for the use of one-step RT-PCR/qRT-PCR assays for BVDV and BTV, for their considerable sensitivity and to be able to make the diagnosis of a large number of samples. Twenty-one (39,62%) samples were positive for BVDV and 24 (45,28%) for BTV by using one-step RT-PCR. The number of positive samples using one-step qRT-PCR was higher than one-step RT-PCR with 27 (50,9 %) samples positive for BVDV and 32 (60,4 %) for BTV in semen samples. The occurrence of co-infection was observed in 28,3% (15) of the total analysed samples, being found in all sampled regions. The primers used for the diagnosis of BTV in this work (NS3/seg-10) do not differentiate among serotypes and for this reason the characterization of serotypes circulating in Brazil was held in a lab in the UK (The Pirbright Institute, OIE reference laboratory). The qRT-PCR (seg-2/VP2) was performed to test semen samples and viral isolates, and it confirmed the circulation of BTV-4 and the first time the circulation of BTV-8, BTV-10 and BTV-16 in Brazil. Two semen samples were positive for different BTV (BTV-4, BTV-8, BTV-10 and BTV-16 to a sample, BTV-4 and BTV-10 to another sample), and both are also positive for BVDV-1. The results of this study confirm the high prevalence of BVDV and BTV virus in bovine semen samples from Brazil, as a single infection or co-infection, demonstrating the importance of testing each seminal batch, and the health risk represented by a single sample not tested for a herd. They also show the need for revision of control measures of bovine semen in our country.

**Keywords:** RT-PCR, qRT-PCR, bovine semen, diagnosis, BTV, BVDV

---

## INTRODUÇÃO

---

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 possui 207 milhões de cabeças (IBGE.gov.br); um quinto de toda carne produzida no Brasil é exportada para 180 países; e a estimativa de lucro bruto na produção leiteira e de carne é de 67 bilhões de reais, com participação de todos os estados brasileiros (agricultura.gov.br).

A ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial- <http://www.asbia.org.br>) relatou o grande crescimento do setor nos últimos anos, próximo dos 30%, ou seja, mais que o dobro do crescimento do PIB brasileiro. Ainda segundo esta associação, somente no ano de 2012 comercializou-se no Brasil 6.575.601 doses de sêmen nacional e 5.764.720 doses de sêmen importado, mostrando a evolução efetiva da inseminação artificial em nosso país, com destaque para o produto produzido internamente, que possui um grande potencial de exportação, uma vez que seja bem certificado.

Segundo a instrução normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), somente poderá ser distribuído no Brasil o sêmen bovino ou bubalino coletado em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Estes CCPS devem cumprir os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no país, indicando para a avaliação das doenças virais somente a Diarreia Viral Bovina.

Embora a última instrução normativa da SDA preconize a avaliação do BVDV (*Bovine viral diarrhoea virus*) no sêmen bovino e bubalino (além das doenças bacterianas), outros agentes de importantes doenças virais são comprovadamente disseminados via sêmen. Além dos vírus classicamente descritos como passíveis de serem transmitidos pelo sêmen como o BVDV (Kirkland *et al.*, 1997) e o BoHV-1 (*Bovine herpesvirus 1*), outros vírus possuem a transmissão bem descrita, como o vírus da Febre Aftosa (*Foot and mouth disease virus* - FMDV) e da Estomatite Vesicular (*Vesicular stomatitis virus* - VSV). O vírus da Língua Azul (*Bluetongue virus* - BTV) pode ser detectado esporadicamente no sêmen de touros virêmicos, resultando em transmissão. Segundo muitos autores o risco de transmissão do vírus da leucose enzoótica bovina (*Bovine leukemia virus* - BLV) é baixo, porém, sabe-se que havendo células leucocitárias no sêmen, estas podem transmitir o vírus.

O Código Sanitário para os Animais Terrestres (*Terrestrial Animal Health Code* © OIE – 2013 -22<sup>th</sup> edition incorporates modifications to the Terrestrial Code agreed at 81<sup>th</sup> OIE General Session in May 2013 - chapter 4.5 - Collection and processing of bovine and small ruminant semen - [http://www.oie.int/eng/normes/en\\_mcode.htm](http://www.oie.int/eng/normes/en_mcode.htm)) preconiza o teste de outros agentes virais de importância, estes com circulação conhecida em nosso país. Dentre os testes preconizados para a detecção de agentes virais no sêmen está o isolamento viral e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), indicadas pela OIE para a detecção para alguns agentes, dentre eles o BVDV, BTV e BoHV-1. Relatos têm demonstrado que o sêmen *in natura* apresenta limitação para isolamento viral devido às suas características citotóxicas, como a grande quantidade de lipídeos e proteínas no plasma seminal. Portanto, a melhoria da sensibilidade de detecção de agentes virais tem sido baseada na incorporação de testes de PCR ao diagnóstico de rotina.

Devido à importância do sêmen e sua comercialização, e da necessidade de ações afirmativas de controle de doenças virais transmitidas pelo mesmo, este projeto objetiva o desenvolvimento e padronização de testes diagnósticos para a detecção dos vírus BVDV e BTV em sêmen bovino, bem como avaliar, com os testes desenvolvidos, amostras clínicas de sêmen *in natura* provenientes de animais naturalmente infectados do estado de Minas Gerais, e caracterizar estas amostras utilizando o sequenciamento gênico seguido de inferência filogenética.

### RESUMO

O *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV) é um vírus de distribuição mundial e é também considerado um patógeno de importância na cadeia reprodutiva bovina. Possíveis consequências da infecção em vacas incluem morte embrionária, aborto, má formação congênita, nascimento de cria fraca e de animais persistentemente infectados (PI). Touros PI e touros com infecção por BVDV eliminam o vírus no sêmen e podem disseminar a infecção viral dentro de uma população bovina. Com o crescimento significativo da inseminação artificial e outras técnicas reprodutivas, tornou-se importante o teste de amostras de sêmen para reduzir o risco da infecção viral causada pelo BVDV. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de técnicas de RT-PCR e qRT-PCR, *one-step* e *two-step*, para o diagnóstico rápido, específico e sensível do BVDV em amostras de sêmen e vírus em cultura de células. O resultado obtido na análise da sensibilidade analítica utilizando a técnica RT-PCR *one-step* foi de  $1,6 \cdot 10^1$  TCID<sub>50</sub>/50µL tanto para o vírus BVDV em cultivo celular quanto em sêmen contaminado experimentalmente. Para o teste RT-PCR *two-step* a sensibilidade foi  $1,6 \cdot 10^{-4}$  TCID<sub>50</sub>/50µL e  $1,6 \cdot 10^{-3}$  TCID<sub>50</sub>/50µL, para vírus em cultura celular e amostra de sêmen contaminado, respectivamente. Utilizando a qRT-PCR *one-step* e *two-step*, os resultados foram semelhantes aos encontrados na RT-PCR, tanto *one-step* quanto *two-step*, sendo a única diferença observada na sensibilidade analítica,  $1,6 \cdot 10^0$  TCID<sub>50</sub>/50µL obtida com amostras de sêmen contaminado experimentalmente na qRT-PCR *one-step*. A especificidade do teste de RT-PCR foi confirmada utilizando o vírus da peste suína clássica (*Classical swine fever virus - Pestivirus*), o vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*), *Dengue virus 2* e *Dengue virus 3*, todos do gênero *Flavivirus*, amplificando tanto o BVDV quanto o CSFV. O coeficiente de variação (CV) foi realizado utilizando o valor do *threshold* (Ct.) da qRT-PCR *one-step*, houve variação de 0,11 a 0,23% no valor de CV nas análises intra-ensaios e nas análises inter-ensaios o valor de CV variou de 0,36 a 0,82% entre as amostras.

**Palavras-chave:** RT-PCR, qRT-PCR, BVDV, sêmen, bovino.

## ABSTRACT

The *Bovine viral diarrhoea virus* (BVDV) is a virus, which has spread worldwide and is also an important pathogen in bovine reproductive chain. Possible consequences of infection in cows include repetition of estrus, abortion, congenital malformation, birth of weak calves and birth of animals persistently infected (PI). PI bulls and bulls with BVDV infection, shed the virus in semen and can spread infection within a cattle population. Due to the significant increase of artificial insemination procedures and other reproductive technologies, semen sample testing became very important in order to reduce the risk of BVDV infection. This study aimed to optimize RT-PCR and qRT-PCR techniques using both one-step procedure and two-step procedure, for the rapid and sensitive diagnosis of BVDV in cell culture and semen sample. The analytical sensitivity of the one-step RT-PCR technique for detection of BVDV in cell culture and experimentally contaminated semen was  $1,6 \cdot 10^{-1} \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ . The two-step RT-PCR sensitivity for detection of BVDV in cell culture and semen sample was  $1,6 \cdot 10^{-4} \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$  and  $1,6 \cdot 10^{-3} \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ , respectively. The only difference was the analytical sensitivity obtained with experimentally contaminated semen samples. Using one-step qRT-PCR the result was  $1,6 \cdot 10^0 \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{L}$ . The specificity of RT-PCR assay was confirmed using virus *Classical swine fever* (CSFV), *Yellow fever virus*, *Dengue virus 2* and *3* and BVDV, amplifying both BVDV and CSFV. The CV of intra-assay analysis ranged from 0,11 to 0,23 % and the inter-assay CV ranged from 0,36 to 0,82 %. These results demonstrate that, the two-step test was more sensitive among the tested techniques. All results were considered satisfactory, both RT-PCR and qRT-PCR can be used for the diagnosis of BVDV, not only in semen samples but also in other types of biological samples.

**Keyword: RT-PCR, qRT-PCR, BVDV, semen, bovine.**

## CAPÍTULO 1 *Bovine viral diarrhea virus*

### 1 Revisão

#### 1.1 Introdução

O vírus da diarreia bovina a vírus (*Bovine viral diarrhea virus* - BVDV) é um dos patógenos de bovinos mais importantes e ubíquos em todo o mundo. Está associado as múltiplas manifestações clínicas incluindo enfermidade gastroentérica, doença respiratória, síndrome hemorrágica com trombocitopenia, problema reprodutivo, e imunossupressão, além da doença das mucosas em animais cronicamente infectados. Um dos principais problemas causados pelo BVDV refere-se aos animais infectados *in utero* no primeiro terço de gestação que nascem persistentemente infectados (PI) e são disseminadores do vírus por toda a vida. A prevalência da doença está diretamente relacionada à presença destes animais PI nos rebanhos, além da transmissão viral via sêmen, fômites e transferência de embriões (Gibbs *et al.*, 1979).

#### 1.2 Etiologia

O BVDV é um vírus RNA de fita simples e polaridade positiva, envelopado, com 25nm de diâmetro. Assim como o vírus da peste suína clássica (CSFV – *Classical swine fever virus*) e o vírus da doença das fronteiras (BDV – *Border disease virus*), pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus* (Lindenbach & Rice, 2001). O genoma de 12,5Kb compreende uma única fase aberta de leitura (ORF), flanqueada por regiões não codificantes (UTR), nos finais 5' e 3' (Warrilow *et al.*, 2000). A região 5'UTR é a mais conservada entre os pestivírus, e portanto, importante ferramenta para o uso em diagnóstico (Ridpath, 2005). Três glicoproteínas virais (E0, E1 e E2) estão presentes no envelope, e a presença do envelope torna esses vírus sensíveis a solventes orgânicos e detergentes.

Em comparação com os vírus DNA, os vírus RNA são altamente mutáveis. Os vírus RNA senso positivo, como o BVDV, estão sujeitos a modificações genômicas que envolvem mutações pontuais ou recombinação do RNA viral (Bolin & Grooms, 2004). 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. Assim, a cada ciclo de replicação geram-se mutantes. O conjunto destes mutantes denomina-se quasiespécie (Bolin & Grooms, 2004).

Apesar do potencial para criar novos vírus ser elevado, a menos que se verifique uma vantagem seletiva para um dos mutantes, a população mutante tende a manter uma “sequência-mestre” de bases, que reflete a sequência de bases do vírus original. Isto deve-se ao fato de a maioria das mutações pontuais ser deletéria para a sobrevivência do vírus, ou não proporcionar uma vantagem competitiva, que permita que um dos mutantes domine a quasiespécie. No entanto, a capacidade de gerar constantemente novos mutantes permite uma rápida adaptação do vírus à resposta imunitária do hospedeiro, prolongando a infecção e aumentando o período de excreção de partículas virais (Bolin & Grooms, 2004). No caso do BVDV, a recombinação não tende a criar novos genótipos, mas pode alterar o biótipo viral (Bolin & Grooms, 2004).

O BVDV possui dois biótipos que são as amostras citopatogênicas (CP) e as não citopatogênicas (NCP) de acordo com o efeito da multiplicação em cultivo celular (Gillespie *et*

*al.*, 1960; Chen *et al.*, 2007; Tscherne *et al.*, 2008). Um passo decisivo no entendimento dos biótipos existentes foi a descoberta de que a proteína precursora 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 pestivírus. Em amostras CP a região codificante de p54 possui inserção de sequências das células hospedeiras, sugerindo que esta região apresenta recombinação genética (Collett *et al.*, 1992).

Os dois biótipos podem infectar o útero levando ao abortamento, mumificação fetal, natimortos, anomalias congênitas e ao nascimento de crias fracas. Porém, somente a infecção com amostras NCP durante o estágio inicial do desenvolvimento fetal (de 40 a 120 dias), anterior à maturação do sistema imune fetal, pode resultar no estabelecimento da imunotolerância e de animais persistentemente infectados (Kameyama *et al.*, 2008).

Independente do biótipo, os isolados do vírus da diarreia viral bovina foram inicialmente segregado em dois genótipos: 1 e 2 (Bolin & Grooms, 2004; Potgieter, 2004; Vilcek *et al.*, 2005), de acordo com a análise filogenética da região 5'UTR do genoma e também pela análise fenotípica utilizando anticorpos monoclonais (Mabs) contra a glicoproteína E2 (Pellerin *et al.*, 1994; Ridpath *et al.*, 1994). As amostras mais prevalentes são designadas como BVDV- 1, já as amostras do tipo 2 foram detectadas originalmente em surtos na América do Norte associados a uma grave síndrome hemorrágica (Ridpath *et al.*, 1994). A imunidade cruzada entre o BVDV-1 e BVDV-2 é relativamente baixa, implicando em dificuldades no seu diagnóstico e diminuindo a eficácia de vacinas.

Além destas espécies já reconhecidas, ainda existem alguns pestivírus de origem bovina isolados na última década que ainda não estão classificados e são conhecidos como pestivírus “atípicos”, sugerindo uma possível nova espécie: BVDV-3 (Stahl *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), e que consiste em uma subpopulação de amostras NCP que são capazes de causar efeito citopático em linfócitos em cultura de célula e estão associadas com doença muito grave (Ridpath *et al.*, 2006).

### 1.3 Histórico

A doença induzida pelo BVDV foi descrita pela primeira vez nas décadas de 1940-1960. Em 1946 foi descrita pela primeira vez por Olafson e seus colaboradores, em um rebanho bovino no Estado de Nova Iorque (EUA), como uma doença infecciosa e aguda de bovinos. Posteriormente, outra forma de doença causada pelo BVDV foi identificada e denominada doença das mucosas (DM). No Brasil, em 1972 foi descrito o primeiro isolamento do BVDV (Vidor, 1974). Estudos posteriores confirmaram a presença do agente na população bovina brasileira.

### 1.4 Multiplificação viral

A multiplicação viral ocorre no citoplasma da célula, e a penetração dos vírions nas células ocorre por endocitose (Grummer *et al.*, 2004). A glicoproteína E2 do envelope viral é a principal ligante à superfície celular e responsável pelo tropismo viral (Thiel *et al.*, 1996), e as glicoproteínas E1-E2 são essenciais para a penetração do BVDV (Ronecker *et al.*, 2008). Após

a acidificação dos endossomos ocorre a fusão do envelope com a membrana endossomal então o ácido nucléico é liberado no citoplasma na forma de um complexo de ribonucleoproteína dentro do citosol da célula. A tradução do genoma viral requer a liberação parcial da proteína p14 do RNA para iniciar a primeira biossíntese macromolecular vírus-direcionada. Polipeptídios virais podem ser detectados em células infectadas tão cedo quanto três horas após a infecção, atingindo um pico com 12 a 14 horas pós-infecção (Donis 1995; Gong *et al.*, 1996).

O ciclo de multiplicação viral entra em sua fase de replicação genômica. Primeiro, uma fita negativa é copiada para servir como molde; segundo, a nova progênie de RNA é sintetizada usando este molde de polaridade negativa criado (Rodriguez *et al.*, 1993). Inicia-se o empacotamento da progênie e liberação dos vírions, e o ciclo entra em seu estágio final. Estudos com microscopia eletrônica evidenciam que o envelopamento do BVDV ocorre no retículo endoplasmático ou complexo de Golgi. Durante esse processo, os vírions adquirem um envelope protéico, atingindo o compartimento extracelular por transporte vesicular (exocitose), tão cedo quanto 10 horas pós-infecção (Donis, 1995; Gong *et al.*, 1996).

### 1.5 Epidemiologia

As infecções por BVDV são endêmicas no rebanho bovino na maioria dos países com bovinocultura significativa. Os hospedeiros são restringidos aos animais biungulados (ordem *Artiodactyla*, e.g. ruminantes e suínos) (Maurer *et al.*, 2004; Krey *et al.*, 2006; Passler *et al.*, 2009), infectando naturalmente uma variedade de ruminantes domésticos e silvestres; os bovinos são considerados os seus hospedeiros naturais. *In vitro*, o BVDV é capaz de multiplicar em uma variedade de células de cultivo de várias espécies, inclusive de origem humana (Flores *et al.*, 2005). Estudos realizados em alguns países mostraram que a prevalência de BVDV no rebanho bovino pode variar amplamente de 14,6% para 95% na Suécia, Inglaterra e País de Gales, Nova Zelândia e Peru (Niskanen *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1998; Thobokwe *et al.*, 2004; Stahl *et al.*, 2008)

No Brasil, a doença está presente desde a década de 70, distribuída por vários estados. Os índices de positividade sorológica variam de 18 a 84% e os dois genótipos já foram identificados. A prevalência foi estimada nos animais e nos rebanhos bovinos podendo variar de 22%-70% e 58-90%, respectivamente (Canal *et al.*, 1998; Poletto *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2006; Quincozes *et al.*, 2007; Frandoloso *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que a infecção pelo BVDV é difundido no Brasil, mas os estudos observacionais que estimam a prevalência e fatores de risco associados para o BVDV no país ainda estão faltando (Almeida *et al.*, 2013). No Uruguai e na Argentina, países que fazem fronteira com o sul do Brasil, têm a prevalência no rebanho de 100% e 93,1%, respectivamente (Guarino *et al.*, 2008; Carbonero *et al.*, 2011).

### 1.6 Transmissão

O BVDV pode ser transmitido dos animais infectados para os susceptíveis através de contato direto ou indireto, nas quais se incluem a ingestão e a inalação de matéria contaminada com secreções oculares e nasais, saliva, urina ou fezes de animais infectados (Harkness & Van Der Lugt, 1994; Houe, 1999; Lindberg & Houe, 2005; Potgieter, 2004). A transmissão iatrogênica (agulhas ou material cirúrgico contaminado, luvas de palpação, tatuadores, aplicadores de brinco) é ainda descrita, bem como por sêmen contaminado, levando à sua transmissão através da monta natural e da inseminação artificial (Carter, 2004).



A infecção transplacentária é frequente, podendo levar ao nascimento de animais imunotolerantes, persistentemente infectados (PI), que excretam continuamente o vírus para o ambiente.

### 1.7 Patogenia

Numa primeira fase, o BVDV multiplica-se na mucosa nasal e nas tonsilas (Potgieter, 2004). Posteriormente, o vírus multiplica-se nos linfonodos regionais, utilizando os leucócitos para a sua disseminação aos restantes dos órgãos e tecidos, através do sistema linfático (Lee et al., 2009; Potgieter, 2004). Ambos os biótipos do vírus exercem efeito imunossupressor, ao modularem tanto a imunidade inata como a imunidade adquirida do hospedeiro (Peterhans *et al.*, 2003; Pinchuk *et al.*, 2008). As consequências e a gravidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem o biótipo viral, o *status* imunológico do animal, se a fêmea está gestando ou não, e período da gestação. O biótipo NCP do BVDV é o principal responsável pelas manifestações clínicas causadas pela infecção viral que se apresentam de diversas formas (Baker, 1995; Bolin & Grooms, 2004).

Apesar de receber a denominação de vírus da diarreia viral bovina, o BVDV afeta especialmente o aparelho reprodutor (Carter, 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 por monta natural ou por inseminação artificial (Grooms, 2004; Givens *et al.*, 2009; Marley *et al.*, 2009). Os machos PI eliminam, igualmente, o vírus no sêmen (Houe, 1999). Nas vacas PI, os ovários encontram-se, frequentemente, hipoplásicos e o número de folículos reduzido, quando em comparação com vacas saudáveis (Grooms, 2004). Nas fêmeas não-PI, a infecção aguda pelo vírus pode resultar em disfunção reprodutiva (McGowan *et al.*, 2003).

### 1.8 Animais persistentemente infectados

Em fêmeas prenhes a doença aguda leva ao abortamento, mumificação fetal, natimortos, anomalias congênitas e ao nascimento de crias fracas. A infecção com amostras do biótipo NCP durante o estágio inicial do desenvolvimento fetal (40 a 120 dias), anterior à maturação do sistema imune fetal, pode resultar no estabelecimento da imunotolerância e de animais persistentemente infectados (PI) (McClurkin *et al.*, 1984) e todos os filhos de vacas PI são PI. Estes animais excretam o vírus durante toda a vida, constituindo-se no principal reservatório e fonte de disseminação viral entre os animais (Houe, 1995). A maioria destes animais vivem entre 6 meses a dois anos, em média, e podem desenvolver uma forma fatal da infecção conhecida como doença das mucosas, além do seu potencial imunossupressor, que tem um papel decisivo no estabelecimento de infecções oportunistas por outros patógenos, principalmente respiratórios e entéricos.

### 1.9 Doença das mucosas

A doença das mucosas (DM) se apresenta na forma de lesões ulcerativas gastrointestinais, hemorragia e diarreia, e acontece devido a mutações do vírus persistente (NCP → CP) ou superinfecção com vírus CP vacinal ou de campo em animais PI (Baker, 1995; Bolin, 1995) A DM é uma seqüela tardia da infecção persistente estabelecida pelo BVDV (Baker, 1995; Tautz

*et al.*, 1998). A DM também pode se apresentar na forma crônica, em que os sinais clínicos são inespecíficos, em um quadro de definhamento progressivo prolongado, podendo apresentar lesões orais e na pele (Ferreira *et al.*, 2008).

### 1.10 Diagnóstico

Deve-se suspeitar de infecção pelo BVDV sempre que houver uma ocorrência de perdas relacionadas à reprodução; além disso, casos de doença entérica e/ou respiratória com componentes hemorrágicos (melena, petéquias em mucosas, serosas, etc.), erosões e ulcerações no trato digestivo também são sugestivos dessa infecção. Essas manifestações ocorrem principalmente, mas não exclusivamente, em animais jovens. Bezerros fracos, com crescimento retardado e predisposição a outras enfermidades devem ser considerados potencialmente suspeitos de serem PI. Exames laboratoriais são essenciais para confirmação do diagnóstico. Existem várias técnicas padronizadas para esse fim como o isolamento do agente em cultivos celulares, considerado o padrão, além de imuno-histoquímica (IHC), RT-PCR, vírus neutralização e ELISA. Cada teste possui seus pontos fortes e fracos, assim como sua sensibilidade, especificidade, custo e o trabalho laboratorial. Entretanto, o isolamento viral é muito trabalhoso e consome muito tempo para o diagnóstico. ELISA indireto pode ser realizado com um número grande de amostras, mas não é eficaz para a detecção de animais PI, e o ensaio de IHC consome muito tempo para ser realizado. Portanto, a PCR é o método mais rápido e eficaz para a detecção do BVDV em sêmen e em outras amostras clínicas (Yan *et al.*, 2011).

### 1.11 Controle

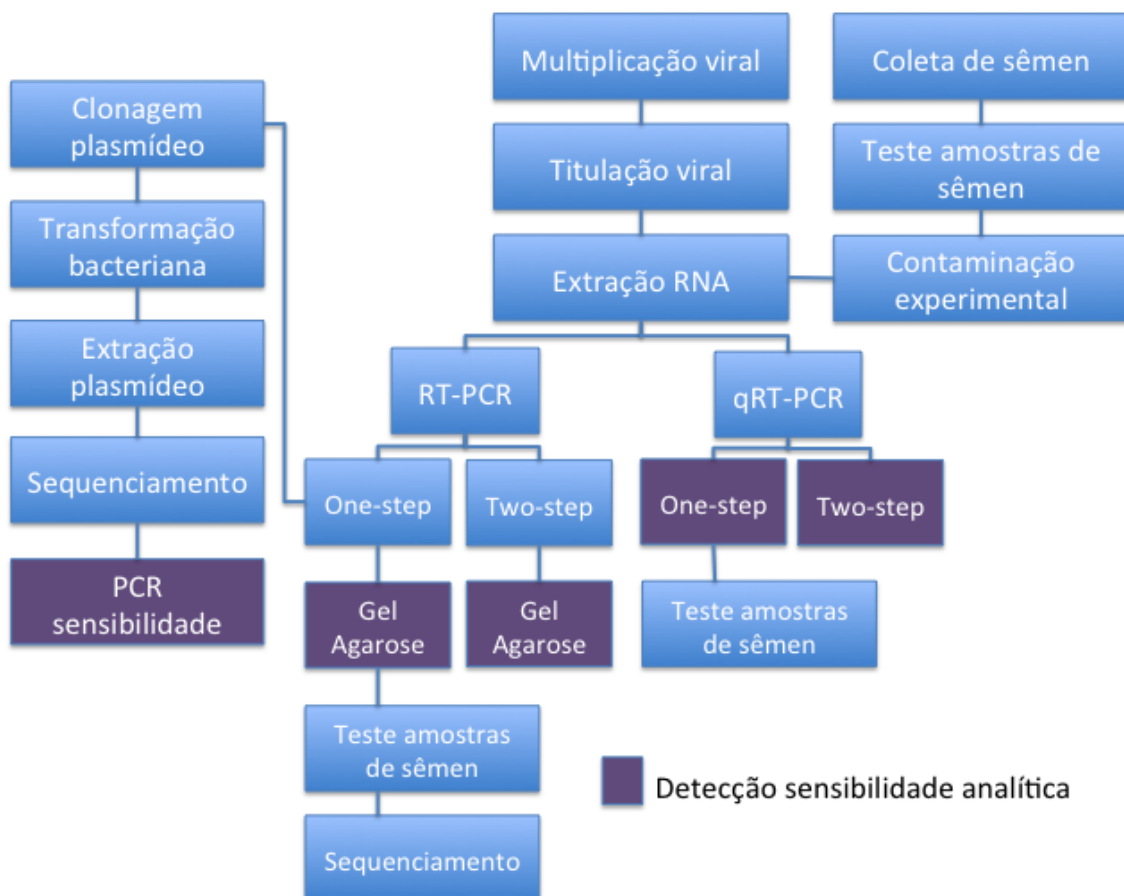
As vacinas devem proteger os animais da doença clínica e, principalmente, impedir a transmissão transplacentária e a infecção fetal (Van Oirschot *et al.*, 1999). Atualmente existem dois tipos principais de vacinas contra o BVDV: as vacinas inativadas e as vacinas vivas modificadas (Van Oirschot *et al.*, 1999; Fulton *et al.*, 2003). Entretanto, a principal medida de controle da infecção pelo BVDV baseia-se na identificação e eliminação dos animais PI, associado ou não ao uso de vacinas (Bolin, 1995).

Em um trabalho conduzido por Rikula e colaboradores (2008), investigações epidemiológicas apontaram o sêmen utilizado em inseminação artificial como a única fonte plausível de infecção de BVDV em 10 rebanhos leiteiros avaliados. Rastrearam a infecção com base em uma modificação rara na sequência viral 5' UTR encontrada em todas as sequências analisadas, comprovando a importância do sêmen como fonte de contaminação e disseminação viral.

Diante da importância deste agente viral bovino, esse trabalho teve como objetivo a padronização de um teste de RT-PCR e qRT-PCR para o diagnóstico do BVDV em amostras de sêmen podendo, desse modo, servir como ferramenta para uso em programas de controle, visando diminuir a ocorrência da transmissão do vírus nos rebanhos bem como perdas relacionadas à infecção viral.

## 2 Material e Métodos

### Fluxograma de atividade



### 2.1 Multiplicação e titulação viral

A amostra padrão utilizada foi a BVDV-1 NADL (ATCC 1422-CP). O vírus foi multiplicado em células *Mardin-Darby bovine kidney* (MDBK/ATCC CCL-22) mantidas em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal equino (SFE) (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e 2 U/ml de Penicilina, 2 µg/ml de Estreptomicina e 10 µg/ml de Anfotericina B.

A multiplicação viral foi realizada em frasco de T-75 cm<sup>2</sup> (TPP-Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suíça) com 90% de confluência da monocamada celular. O meio de cultura contendo SFE (GIBCO) contido no frasco para manutenção da célula foi retirado e a monocamada lavada três vezes com tampão fosfato salina 1X (PBS- sigla inglês). Posteriormente, 3 mL do inóculo viral BVDV-1 NADL diluído 1:10 em meio D-MEM foi adicionado às células e feita a adsorção viral por uma hora em incubadora (Thermo Scientific,

Waltham, MA, EUA), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Transcorrido o período de adsorção viral foi adicionado DMEM com SFE (GIBCO) na concentração final de 5% e as culturas foram mantidas em incubadora (Thermo Scientific) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> até o aparecimento do efeito citopático (ECP).

A titulação viral foi realizada utilizando a célula MDBK, em placas de 96 poços (Corning, Tewksbury, MA, EUA), adicionando-se 100 µL de meio DMEM (Sigma-Aldrich) com 50.000 células por cm<sup>2</sup> e 5% SFE (GIBCO), seguido de incubação (Thermo Scientific) por 24 horas à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a monocamada celular apresentar confluência de aproximadamente 90%, foi feita a diluição do vírus BVDV-1 NADL em escala logarítmica seriada de base 10 (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>), e adição de 50 µL/poço. Foram realizadas oito replicatas por cada diluição. A adsorção viral foi realizada por uma hora em incubadora (Thermo Scientific) à temperatura de 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após, foi adicionado 100 µL de meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com SFE (GIBCO) na concentração final de 2,5%. A placa foi novamente incubada (Thermo Scientific) à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O aparecimento do efeito citopático foi observado diariamente e a leitura final realizada com 96 horas. O cálculo da titulação do vírus foi realizado através do método de Reed & Muench (1938).

## 2.2 Extração de RNA

Após o cultivo celular para multiplicação viral, os frascos contendo os vírus foram congelados e descongelados por três ciclos consecutivos e processados para a obtenção de RNA viral. O conteúdo da lise celular causada pelo congelamento/ descongelamento foi centrifugado a 584 x g (Jouan BR4i, Thermo Scientific) por 5 minutos a 18°C, para remoção de debris celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo o vírus foi alíquotado e armazenado em nitrogênio líquido. Foi realizada a diluição do vírus BVDV-1 NADL em PBS no volume total de 500 µL e adicionado 1 mL de Tri-reagente (Sigma-Aldrich). Após a homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos foram adicionados 200 µL de clorofórmio 100% (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA), seguida da agitação vigorosa por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g (MicroCL 17R, Thermo Scientific) por 15 minutos a 4°C, sendo obtida uma mistura trifásica: uma fase aquosa transparente superior, uma interfase branco-leitosa e uma fase vermelha clara inferior (fenol-clorofórmio). A fase aquosa, onde o RNA permanece, foi transferida para um microtubo 1,5 mL e o RNA foi precipitado adicionando-se 500 µL de álcool isopropílico (Merck). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se uma etapa de centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a lavagem do RNA com 1 mL de álcool etílico 75% (Merck) e centrifugação a 7500 x g por 5 minutos a 4°C, o RNA foi seco ao ar brevemente, e, após, eluído em 20µL de água livre de nuclease e adicionado de 0,93 µL de *RNasin* (Promega, Madison, WI, EUA). Após incubação das amostras a 56°C por 10 minutos, as mesmas foram armazenadas a -80°C (Thermo Scientific) até o momento do uso.

## 2.3 Iniciadores e otimização RT-PCR

Os iniciadores para BVDV foram desenhados através do programa *primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) e o programa *Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) utilizando a região não codificadora 5'(5'-UTR) de amostras previamente depositadas no *Genbank* (M31182/BVD-1 NADL, AY149216/BVD-2 e FJ387232/BVD-1NY-1). Esta região oferece a vantagem de ser

conservada, mas, por possuir regiões intervaladas com variações, favorece a tipagem de amostras circulantes.

Iniciadores para controle interno foram feitos para confirmar a acessibilidade do RNA nas amostras a serem testadas. Desenhou-se iniciadores para o gene *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) bovino (*Genbank* NM\_001034034.1 - Tabela 1).

**Tabela1.1** Iniciadores, orientação e tamanho esperado do *amplicon* do gene 5'UTR do BVDV e do normalizador GAPDH.

Iniciadores	Vírus – Acesso no <i>GenBank</i> e posição	<i>Amplicon</i>
<b>Antisenso</b> 5' catgtccatgtacagcagag 3'	BVDV-1 NADL (M31182) (2-292) BVDV-1 NY-1 (FJ387232)(2-291) BVDV-2 (AY149216) (2-292)	290pb
<b>Senso</b> 5'aggctagccatgcccttagt 3'	BVDV-1 NADL (M31182) (2-292) BVDV-1 NY-1 (FJ387232) (2-291) BVDV-2 (AY149216) (2-292)	
<b>Antisenso</b> 5' caccacctgttctgttagcctaat 3'	GAPDH RNA (NM_001034034.1) (908-1007)	99pb
<b>Senso</b> 5' ttgtctctgcgacttcaacagcg 3'	GAPDH RNA (NM_001034034.1) (908-1007)	

Para a otimização da RT-PCR *one-step* para BVDV e GAPDH, foram testadas quantidades variáveis de RNA, temperatura de anelamento e a concentração dos iniciadores. Foi utilizado o Kit *Access Quick RT-PCR System* (Promega), reação total de 25 µL: 12,5 µL *Access Quick Master Mix 2x*, 6 µL água livre de nuclease e 0,5 µL da enzima *AMV reverse transcriptase* (2,5 U), etapa realizada em fluxo laminar (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil). O RNA (4 µL) foi adicionado em microtubo de PCR junto com o iniciador, 1 µL de cada na concentração 10 pM/µL, e foi realizada uma etapa de desnaturação inicial à 70°C por 10 minutos e 5 minutos a 4°C. Após essa etapa, 19 µL do *mix* de reagente, previamente preparado, foram adicionados ao RNA desnaturado, utilizando uma capela (*DNA/RNA workstation* Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). O ciclo da PCR foi de 45°C por 45 minutos, 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos 94°C desnaturação, 60°C anelamento e 72°C extensão por 45 segundos cada etapa e extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, ao volume total de 25 µL foi adicionado 2 µL do corante *6X Blue/Orange Loading Dye* (Promega) e realizada a eletroforese (Locus Biotecnologia) em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2), acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen), visualizado e fotografado em transiluminador UV (UVP, Upland, CA, EUA). Todos os experimentos realizados com RT-PCR e qRT-PCR *one-step* e *two-step* foram conduzidos utilizando fluxo laminar para preparação do *mix* de reagentes (Pachane) e a capela (Locus Biotecnologia) para a introdução do RNA teste aos tubos contendo o *mix* de reagentes.

Foi realizado um experimento em paralelo para comparar a sensibilidade analítica da RT-PCR *one-step* com a RT-PCR *two-step* onde se realizou um passo de transcrição reversa a partir de um molde de RNA, utilizando o kit *Improm II* (Promega), seguida de PCR utilizando a enzima *Go taq* (Promega) e o cDNA como molde. Em um microtubo foram adicionados 4 µL do RNA extraído, 1 µL de cada iniciador (10 pMol/µL), aquecimento a 70°C por 10 minutos, seguido de incubação no gelo por 5 minutos. Após a etapa de desnaturação, foi adicionado o *mix* de reagentes da reação de transcriptase reversa (RT), previamente preparado: 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25

mM, 2 µL de tampão RT 10X, 2 µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP mix-200 mM) (Promega), 0,5 µL de *RNasin* (Promega), 1 µL da enzima RT e 4,5 µL de água livre de nuclease. O ciclo da RT foi de 25°C por 15 minutos, 42°C por 1 hora e 72°C por 15 minutos. Após a etapa de produção do cDNA, para otimização da PCR, foi utilizado o volume final da reação de 20 µL: 4 µL do *buffer* 5X da enzima ( $MgCl_2$  1,5 mM, contido no tampão), 1 µL de cada iniciador (concentrações 10 pMol/µL), 0,4 µL dNTP *mix* (200mM) (Promega), 9,5 µL água livre de nuclease, 0,1µL da enzima *taq* DNA polimerase (0,5U) e 4µL do cDNA. O ciclo da PCR consistiu de desnaturação inicial: 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos: 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com extensão de 72°C por 7 minutos.

Foi realizada a eletroforese (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris-Borato, 2mM EDTA, pH 8,2) acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen), visualização e registro fotográfico com auxílio do transiluminador UV (UVP).

#### 2.4 Clonagem plasmidial

Posteriormente à amplificação da amostra viral BVDV-1 NADL por RT-PCR *one-step*, foi realizada eletroforese (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1,2% (Invitrogen) corado com brometo de etídio (Invitrogen) e visualizado em transiluminador UV (UVP). Após a corrida em gel de agarose o DNA foi purificado através do método *freeze-squeeze* (Tautz & Renz, 1983); brevemente, o DNA foi recortado do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina de bisturi e o transiluminador UV (UVP). Posteriormente foi cortado em pequenos pedaços com a lâmina de bisturi e congelado a -80°C por 30 minutos. Após o período, foi centrifugado a 17.000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 5 minutos. Utilizando uma pipeta, o sobrenadante foi retirado e estocado a -20°C até o uso em clonagem em vetor plasmidial *pGEM-T easy* (Promega).

A ligação do inserto ao plasmídeo foi realizada utilizando 5 µL do DNA purificado do passo anterior, 7,5 µL do tampão *2x Rapid Ligation*, 1µL do vetor *pGEM-T easy* (Promega) e 1,5 µL do *T4 DNA ligase*. A mistura foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente e, posteriormente, *overnight* a 4°C. Seguiu-se a transformação bacteriana.

#### 2.5 Transformação bacteriana

A transformação foi realizada em bactéria *Escherichia coli* *gold* XL10 (Invitrogen) quimicamente competente. Brevemente, foi adicionado ao produto da ligação do passo anterior 100 µL de *E. coli* XL10 competente, seguida da incubação por 20 minutos no gelo e posteriormente choque térmico a 42°C por 50 segundos, com nova incubação no gelo por 2 minutos. A bactéria transformada foi transferida para um tubo de 15 mL contendo 900 µL de meio Luria Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5% p/v, Triptona 0,1% p/v, NaCl 0,5% p/v, H<sub>2</sub>O q.s.p), incubada por 90 minutos a 37°C, na velocidade de 150 rpm no agitador orbital (Thermo Scientific) e, posteriormente, plaqueada 100 µL da cultura bacteriana foram semeadas em placa de petri com meio LB ágar (Ágar 1,5% p/v), contendo *X-gal* (25 µg/mL-Invitrogen) e ampicilina na concentração final 100 µg/mL (Sigma-Aldrich). A incubação a 37°C foi realizada por 24 horas e foram selecionadas as colônias de coloração branca.

## 2.6 Extração plasmidial em pequena escala

As colônias selecionadas foram crescidas em 10 mL de meio LB com ampicilina na concentração final de 100 mg/mL (Sigma-Aldrich) por 16 horas. Posteriormente, foram separados 4 mL da cultura bacteriana em tubo de 15 mL (TPP) para a extração do plasmídeo recombinante. Após centrifugação a 1000 x g (MicroCL 17R-Thermo Scientific) por 10 minutos a 25°C, o sedimento foi ressuspenso em 200 µL da solução GET/RNase (9 g glicose; 2,5 mL TRIS-HCl 1M; 5 mL EDTA 0,2 M; RNase 10 mg/mL-Invitrogen) e adicionou-se 400 µL da solução de lise (5 mL de dodecil sulfato de sódio-SDS 20%; 2 mL NaOH 10M) e 400 µL da solução neutralizante (13 g de acetato de sódio, para 100 mL de solução, pH 4,8 ajustado com ácido acético glacial). Após homogeneização suave, o conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, incubado no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugado a 10000 x g (MicroCL 17R-Thermo Scientific) por 15 minutos a 8°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 600 µL de álcool isopropílico, seguido de homogeneização e centrifugação 10000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por inversão e adicionou-se 500 µL de álcool etílico 70% (Merck), seguido de homogeneização e centrifugação a 10000 x g por 5 minutos; o sobrenadante foi retirado por inversão novamente e o sedimento eluído em 20 µL de água livre de nuclease. A concentração do plasmídeo recombinante foi dosada em aparelho *NanoDrop* (NanoDrop Technologies, EUA) e o plasmídeo recombinante foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

## 2.7 Contaminação experimental de amostra de sêmen

Como relatado na literatura, amostras de sêmen normalmente contêm inibidores para PCR (Rocha *et al.*, 1998). Desta forma, uma amostra de sêmen bovino negativa, anteriormente testada através da RT-PCR para BVDV desenvolvida neste trabalho, foi utilizada para realizar análises de sensibilidade analítica, comparativa entre vírus em cultura de célula e em amostras de sêmen contaminado experimentalmente. O sêmen foi descongelado e em seguida contaminado com BVDV-1 NADL. Foram utilizados 50 µL do estoque de vírus e adicionados 450 µL de sêmen, na diluição de 1:10 do estoque inicial (concentração final no sêmen  $1,6 \cdot 10^2$  TCID<sub>50</sub>/50µL). As amostras foram mantidas sob agitação de 160 rpm no agitador orbital (Thermo Scientific), por 90 minutos a 37°C e armazenadas a 4°C para o uso subsequente.

## 2.8 qRT-PCR

A otimização da qRT-PCR foi determinada pela variação da quantidade de iniciador e a temperatura de anelamento, porém a quantidade de reagentes do *mix* e o ciclo da qRT-PCR foi utilizado conforme recomendado pelo fabricante. A qRT-PCR *one-step* foi realizada utilizando *Power SYBR®Green RNA-to-CT™-Step Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), em um volume total de 25 µL. Brevemente, para uma reação foi utilizado 12,5 µL do tampão *Power SYBR®Green RT-PCR Mix 2X*, 0,2 µL *RT Enzyme Mix 125X*, 0,5 µL de cada iniciador (concentração 10 pM), 6,3 µL de água livre de nuclease e finalmente, 4 µL do RNA molde. A qRT-PCR foi realizada no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System™*. O ciclo da qRT-PCR *one-step* consiste em 48°C para a realização da transcrição reversa, 95°C para desnaturação da enzima e 40 ciclos: desnaturação 95°C por 15 segundos e anelamento 60°C por 1 minuto, sendo que nesta última fase ocorreu a detecção da fluorescência. Em cada

amplificação foi avaliado o ciclo que apresentou o limiar de fluorescência (*threshold cycle-Ct*) e o número de ciclos da RT-PCR em que foi detectada fluorescência. As amostras consideradas positivas apresentavam o valor de *Ct*. inferior ou igual a 35, acima deste valor a mesma foi considerada inconclusiva. Amostras negativas não tiveram valor de *Ct*. detectado.

A qRT-PCR *two-step* foi realizada utilizando o *PowerSYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems), com um volume total de 25 µL. Brevemente, para cada reação foi utilizado 12,5 µL do tampão *PowerSYBR® Green Master Mix 2X*, 0,5 µL de cada iniciador (concentração de 10 pMol/µL), 6,5 µL de água e finalmente, 4 µL do cDNA (a etapa de transcrição reversa é a mesma utilizada da secção 2.3). O ciclo da qRT-PCR *two-step* consiste em 95°C para desnaturação da enzima e 40 ciclos: desnaturação 95°C por 15 segundos e anelamento 60°C por 1 minuto, nesta última fase que ocorreu a detecção da fluorescência. O valor do *Ct*. foi estabelecido de maneira similar a qRT-PCR anterior.

## 2.9 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica da qRT-PCR, RT-PCR *one-step* e *two-step*, foram testadas através de diluições seriadas na base 10 do plasmídeo recombinante contendo o inserto de BVDV-1 NADL, e do RNA extraído do vírus BVDV-1 NADL em cultura celular e amostra de sêmen experimentalmente contaminada para estabelecer o limite de detecção. O intervalo da diluição foi de 10<sup>2</sup> e 10<sup>-5</sup>.

## 2.10 Especificidade analítica

Para conferência da especificidade, foram avaliados nos sistemas desenvolvidos outros membros da família *Flaviviridae*. Foram testadas com a RT-PCR desenvolvida para a região gênica 5'-UTR de BVDV os vírus: *Dengue virus 2 e 3* (Den-2 e Den-3, respectivamente - gênero *Flavivirus*), vírus da febre amarela (*Yellow fever virus – YFV – gênero Flavivirus*). Para o vírus da peste suína clássica (*Classical swine fever virus – CSFV – gênero Pestivirus*), o RNA foi gentilmente cedido pelo LANAGRO – Pedro Leopoldo, após anuência formal do MAPA.

## 2.11 Sequenciamento

O plasmídeo contendo o inserto de BVDV-1 NADL foi sequenciado utilizando *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (Applied Biosystems). Resumidamente, a PCR do sequenciamento foi realizada utilizando 1,5 µL do tampão de sequenciamento 5x, 1 µL do *BigDye*, 5,5 µL de água livre de nuclease, 1 µL de cada iniciador M13 senso e antisense (analisados em microtubos separados) na concentração de 10 pMol/µL e 1 µL da amostra alvo (100 ng). A PCR foi conduzida (Termociclador Techne) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação 96°C por 15 segundos, anelamento 50°C por 15 segundos e extensão 72°C por 4 minutos. Após a reação de PCR seguiu-se a precipitação da amostra, adicionando-se 40 µL de álcool isopropílico 40% (Merck) preparado no momento do uso e incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, protegido de luz. A centrifugação foi realizada a 17000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado, acrescentou-se 500µL de álcool etílico 60% (Merck) e centrifugou-se novamente a 17000 x g por 10 minutos. O sedimento foi deixado secar ao ar e ressuspendido em 15 µL de formamida HIDI (Applied Biosystems). Em seguida, a mistura foi agitada em aparelho tipo *vortex* por 10 segundos e armazenada a 4°C até o momento de se colocar no



sequenciador 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). A sequência obtida foi analisada utilizando-se os softwares teóricos (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> e <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) para a resolução de ambiguidades, com posterior comparação a sequências previamente depositadas no banco mundial de dados gênicos, *GenBank*.

### 3 Resultados e discussão

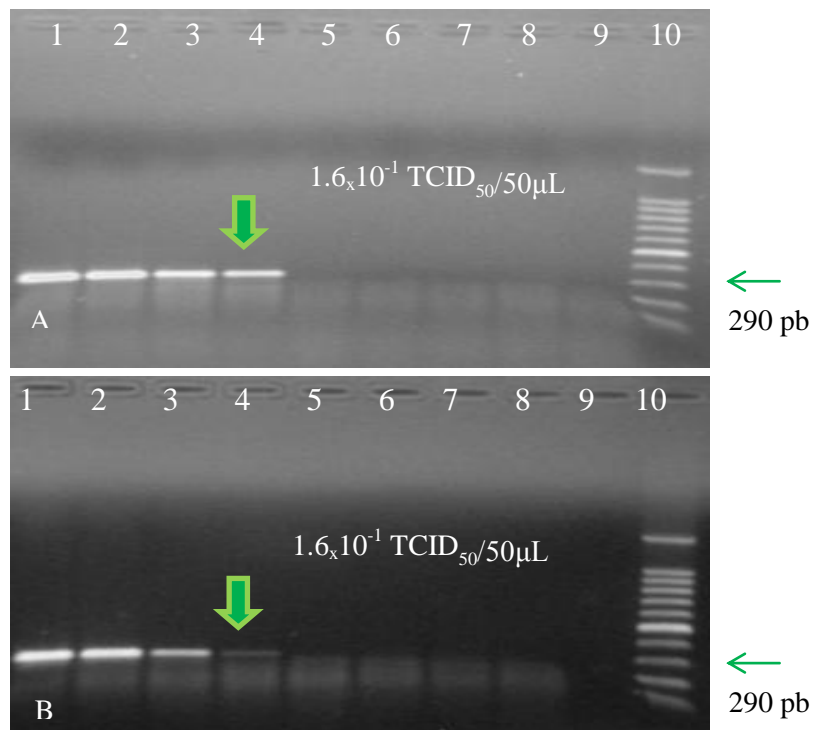
#### 3.1 Multiplificação e titulação virais

Após incubação por 96 horas em incubadora (Thermo Scientific) à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, a monocamada celular apresentou efeito citopático viral característico de infecção pelo BVDV-1 NADL, como morte e lise celular. O título viral foi de 1,6.10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>/50µL.

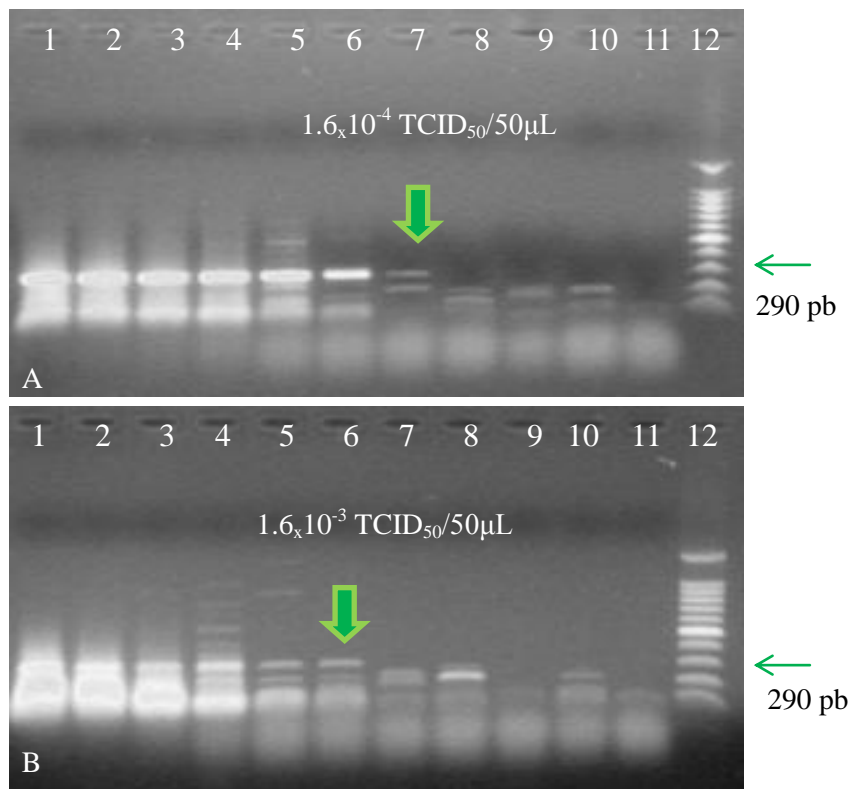
#### 3.2 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica está representada nas figuras abaixo. A Figura 1.1 apresenta o resultado da RT-PCR *one-step* utilizando como molde a diluição seriada na base 10 do RNA extraído de cultivo celular ou a partir de amostras de sêmen contaminadas experimentalmente com o vírus BVDV-1 NADL. O limite de detecção para ambas as amostras foi de 1,6.10<sup>1</sup>TCID<sub>50</sub>/50µL. Na figura 1.2 observa-se o resultado da RT-PCR *two-step*, utilizando como molde o cDNA preparado e o kit *Improm II* (Promega) a partir de RNA extraído de amostra viral em cultivo celular ou de amostra seminal experimentalmente contaminada, seguido de PCR utilizando a enzima *Go taq* (Promega). A sensibilidade foi de 1,6.10<sup>4</sup>TCID<sub>50</sub>/50µL para amostra viral em cultivo celular, e, do sêmen experimentalmente contaminado foi de 1,6.10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub>/50µL.

A sensibilidade analítica foi expressivamente maior utilizando o RT-PCR *two-step*, primeiramente transcrevendo o cDNA em relação ao teste direto, RT-PCR *one-step*. Porém, em contrapartida, a inclusão de mais uma etapa no diagnóstico pode ser desvantajoso para alguns casos, por exemplo, quando se está testando um grande número de amostras, sendo necessário fazer uma etapa a mais, o que aumenta as chances de ocorrer contaminação entre as amostras, podendo levar a diagnóstico falso positivo. Devido aos resultados encontrados nesse trabalho, todas as análises de amostras de sêmen foram realizadas a partir da RT-PCR *one-step*. Outro ponto a ser destacado foi a qualidade do produto amplificado, onde pode ser observado no teste a partir de cDNA, bandas extras adicionais à banda de tamanho esperado.

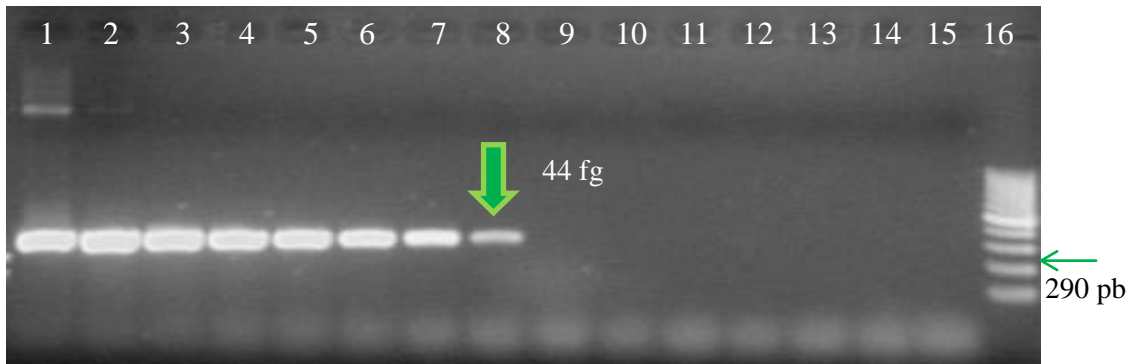


**Figura 1.1: Sensibilidade analítica da RT-PCR desenvolvida (região 5'- UTR) utilizando o *Kit Access Quick* (Promega), para o vírus BVDV 1 – amostra NADL em cultivo celular e amostra de sêmen contaminada experimentalmente.** Sensibilidade analítica do BVDV NADL e em sêmen contaminado experimentalmente com BVDV-1 NADL. Extração do RNA genômico com Tri-reagente (Sigma-Aldrich). Figura A: diluição seriada na base 10 do vírus BVDV NADL ( $10^2$ - $10^{-5}$ ) canaletas 1-8; canaleta 9 controle negativo e canaleta 10 padrão de tamanho molecular 100 pb (Promega). Figura B: diluição seriada na base 10 do sêmen 936 comprovadamente negativo para BVDV, contaminado experimentalmente com o vírus BVDV-1NADL ( $10^2$ - $10^{-5}$ ) canaletas 1-8; canaleta 9 controle negativo e canaleta 10 padrão de tamanho molecular 100 pb (Promega).



**Figura 1.2: Sensibilidade analítica da RT-PCR desenvolvida (região 5'- UTR), utilizando transcrição reversa com o kit *Improm II* (Promega), seguido de PCR utilizando a enzima *Go taq*(Promega), para o vírus BVDV-1 – amostra NADL em cultivo celular e amostra de sêmen contaminada experimentalmente.** Sensibilidade analítica do BVDV-1 NADL em cultivo celular e sêmen contaminado experimentalmente. Extração do RNA genômico com Tri-reagente (Sigma-Aldrich), seguida de produção de cDNA e PCR. Figura A: diluição seriada na base 10 do vírus BVDV NADL ( $10^2$ - $10^{-7}$ ) canaletas 1-10; canaleta 11 controle negativo e canaleta 12 padrão de tamanho molecular 100pb (Promega). Figura B: diluição seriada na base 10 do sêmen 936 comprovadamente negativo para BVDV contaminado experimentalmente com o vírus BVDV-1 NADL ( $10^2$ - $10^{-7}$ )canaletas 1-10; canaleta 11 controle negativo e canaleta 12 padrão de tamanho molecular 100 pb (Promega).

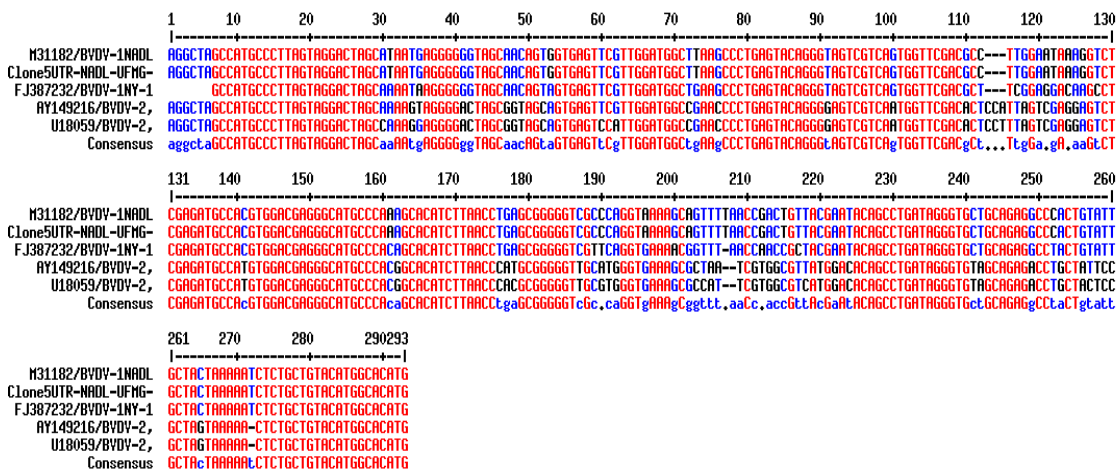
A sensibilidade analítica do plasmídeo recombinante BVDV-1 NADL foi realizada utilizando a enzima *Go taq* DNA polimerase (Promega), conforme descrito anteriormente (item 2.3). Na figura 1.3 observa-se a diluição seriada do plasmídeo recombinante BVDV-1 NADL na base 10, com diluição inicial de 440 ng ( $10^{-9}$ ) até 44 zg ( $10^{-21}$ ) e o limite de detecção foi de 44 fg ( $10^{-15}$ ).



**Figura 1.3: Sensibilidade analítica da PCR para BVDV (região 5'-UTR) utilizando plasmídeo como molde.** Diluição seriada do plasmídeo recombinante contendo o inserto BVDV (amostra NADL-1). Canaletas 1-14: diluição seriada na base 10 começando de 440ng até 44zg, canaleta 15: controle negativo e 16: padrão de tamanho molecular 100pb (Promega). A sensibilidade detectada foi de 44 fg.

### 3.3 Sequenciamento

A especificidade do produto amplificado pela PCR foi também avaliada por sequenciamento do *amplicon* da região 5-UTR do BVDV-1 NADL clonado no plasmídeo *pGEM-T easy* (Promega), utilizando iniciadores universais M13, seguido de alinhamento da sequência obtida com outras amostras previamente depositadas no *GenBank* (Figura 1.4), utilizando os sites <http://multalin.toulouse.inra.fr/multaline> e <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> como ferramentas.



**Figura 1.4: Alinhamento da sequências da região 5'-UTR amplificada a partir do vírus BVDV-1 amostra NADL.** Alinhamento do amplicon clonado em vetor *pGEM-T easy* (Clone-5UTR-NADL-UFGM) realizado com sequências de BVDV-1 citopatogênica (NADL) e não citopatogênica (NY-1) e BVDV-2 previamente depositadas no *GenBank*.

A confirmação da especificidade foi verificada com o alinhamento, onde pode ser verificada a identidade dos nucleotídeos dos *amplicons* provenientes das PCR desenvolvidas baseada na região não codificadora 5'(5'-UTR) com amostras padrão previamente depositadas no *GenBank*, incluindo um depósito da mesma amostra viral representativa do genótipo de BVDV-1 citopatogênica utilizada neste trabalho (NADL), além de mais uma amostra de BVDV-1 não citopatogênica (NY-1) e duas amostras BVDV-2. Foram destacadas a diferenciação dos genótipos 1 e 2, com destaque para as trocas, deleções e inserções.

### 3.4 qRT-PCR

Os experimentos de qRT-PCR *one-step* e *two-step* foram realizados utilizando-se iniciadores da região 5'UTR e o método de extração escolhido foi através do Tri-reagente (Sigma-Aldrich). O limite de detecção da fluorescência foi de  $1,6.10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/50µL para o vírus BVDV-1 NADL, houve diferença de 10 vezes na detecção do vírus em sêmen experimentalmente contaminado, que foi de  $1,6.10^0$ TCID<sub>50</sub>/50µL utilizando *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems), na qRT-PCR *one-step*. Na Tabela 1.2 pode-se observar a média do valor do Ct. na qRT-PCR realizada em triplicata em relação à diluição. A sensibilidade foi melhorada utilizando-se inicialmente a transcrição reversa com o kit *Improm II* (Promega), seguido de qRT-PCR *two-step* utilizando *PowerSYBR® GreenMaster Mix* (Applied Biosystems) e a mesma concentração de iniciador 5 pMol. A sensibilidade para o vírus BVDV-1 NADL em cultivo celular foi de  $1,6.10^{-4}$ TCID<sub>50</sub>/50µL e do sêmen contaminado experimentalmente foi de  $1,6.10^{-3}$ TCID<sub>50</sub>/50µL, mostrando o mesmo fenômeno observado na RT-PCR *one-step*, ou seja, redução de um log na detecção no caso da amostra seminal. Esse resultado pode ser devido a inibidores de PCR presentes no sêmen (Wiedmann *et al.*, 1993; St-Laurent *et al.*, 1994).

**Tabela 1.2 Relação do valor de Ct. na qRT-PCR com a diluição da amostra para BVDV-1 NADL**

Diluição em escala logarítmica seriada base 10	Ct. qRT-PCR <i>one-step</i> BVDV em cultivo celular	Ct. qRT-PCR <i>one-step</i> BVDV sêmen contaminado exp.	Ct. qRT-PCR <i>two-step</i> BVDV cultivo celular	Ct. qRT-PCR <i>two-step</i> BVDV sêmen contaminado exp.
$1,6.10^2$ TCID <sub>50</sub> /50µL	24,80	27,95	17,60	18,28
$1,6.10^1$ TCID <sub>50</sub> /50µL	28,32	30,51	20,74	21,54
$1,6.10^0$ TCID <sub>50</sub> /50µL	31,42	<b>33,63</b>	23,13	24,93
$1,6.10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	<b>34,42</b>	36,57	27,11	28,01
$1,6.10^{-2}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	37,29	Sem Ct.	29,85	31,25
$1,6.10^{-3}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	Sem Ct.	Sem Ct.	32,40	<b>34,30</b>
$1,6.10^{-4}$ TCID <sub>50</sub> /50µL			<b>35,13</b>	38,13
$1,6.10^{-5}$ TCID <sub>50</sub> /50µL			37,95	Sem Ct.

**Negrito- Valor de Ct. considerado positivo**

A especificidade do teste foi confirmada através da presença de todas as diluições na curva de dissociação. A diferença de sensibilidade pode ser devido a inibidores de PCR presente no

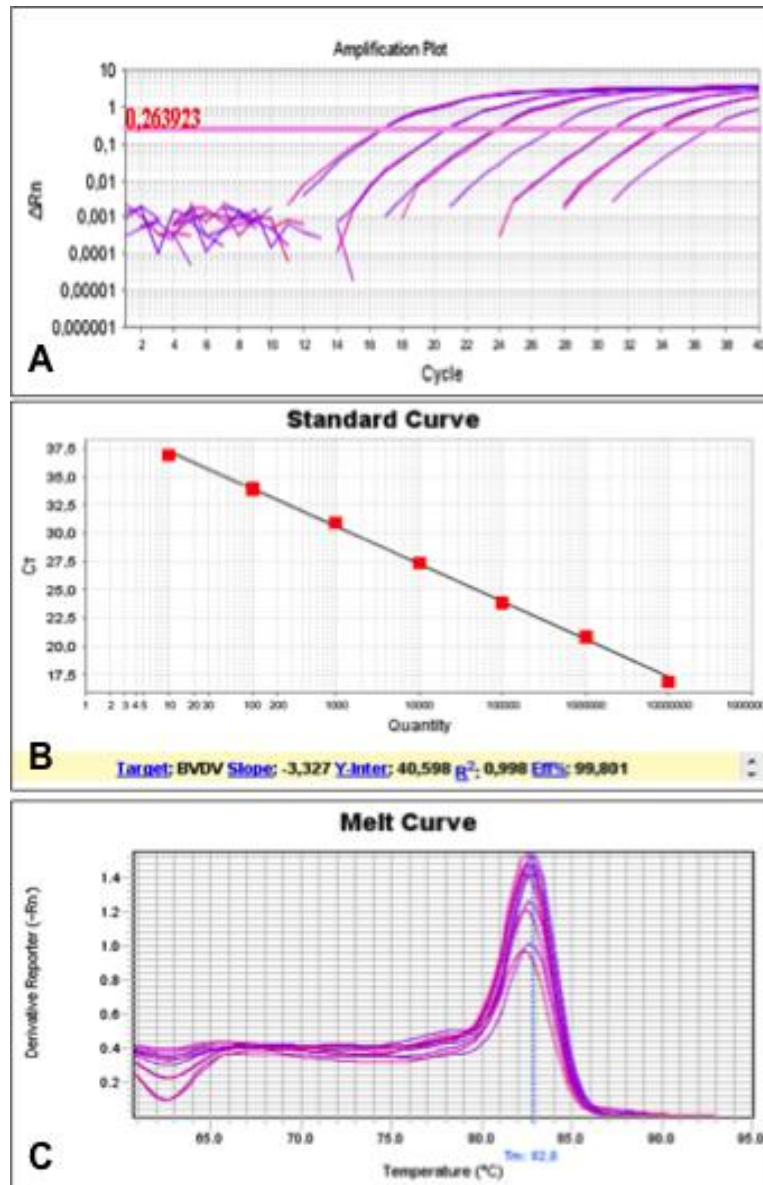
sêmen. Na figura 1.5, observa-se a curva padrão com o plasmídeo recombinante BVDV-1 NADL linearizado diluído na base 10 em triplicata de 1,2 ng a 1,2 ag, obtendo-se o limite de detecção de 1,2 fg ( $10^{-15}$ ) (Figura 5A). Na Figura 5B está representada a curva padrão gerada com *slope* -3,327,  $R^2$  0,997 e eficiência de 99,801%; na Figura 5C a curva de dissociação mostra a especificidade do teste, mostrando um único pico em todas as amostras.

Comparando-se a RT-PCR *one-step* com a qRT-PCR *one-step* os resultados foram semelhantes, diferindo somente na detecção de sêmen experimentalmente contaminado com BVDV com um *log* a menos. Yan e colaboradores (2011) encontraram resultados de 1,33TCID<sub>50</sub> para BVDV-1 e 2TCID<sub>50</sub> para BVDV-2, para BVDV em cultivo celular, a extração foi realizada com TRIzol (Invitrogen), a mesma região gênica deste trabalho e utilizando o Kit da qRT-PCR *One-Step RT-PCR Master Mix* (Qiagen).

No presente trabalho o limite de detecção foi de  $1,6 \cdot 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L para o vírus BVDV-1 e  $1,6 \cdot 10^0$ TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ L para sêmen experimentalmente contaminado na qRT-PCR *one-step*. Zhang e colaboradores (2011) encontraram o limite de detecção de 3,2TCID<sub>50</sub> para BVDV em cultivo celular, utilizando para a extração de RNA o Kit *QIAamp RNA blood purification kit* (Qiagen), qRT-PCR *two-step RotorGene 3000 cycler system* (Corbett) *Taqman* e iniciadores da mesma região 5'UTR. Baxi e colaboradores (2006) encontraram o limite de detecção de 100TCID<sub>50</sub> para BVDV-1 e 10TCID<sub>50</sub> para BVDV-2 em cultura celular, extração realizada com kit *QIAamp viral RNA extraction* (Qiagen), a região gênica 5'UTR e a qRT-PCR *one-step* utilizando *Smartcycler sequence detector* (Cepheid).

Apesar da significativa diferença no limite de detecção entre a qRT-PCR/RT-PCR *one-step* e *two-step* de 3 logs, deve-se ressaltar os benefícios da técnica *one-step*: i-Evita a contaminação da amostra entre os passos RT e a qPCR/PCR; ii-O número de passos diminui e conseqüentemente o tempo de preparo e realização da PCR; iii-Possibilidade de triagem de um grande número de amostras ao mesmo tempo; iv-Aumento da sensibilidade, uma vez que todo o cDNA gerado na transcrição reversa será utilizado na qPCR/PCR. Por outro lado, como todo o cDNA será utilizado como molde na PCR, será necessária uma nova RT para a realização de outros testes ou até mesmo a repetição da PCR, o que inviabiliza repetições, por exemplo, de amostras mais raras.

Outra vantagem dos testes *one-step*, é o potencial que a RT pode ter de causar inibição ou múltipla amplificação na qPCR/PCR. Como pode ser observado neste trabalho, houve presença de bandas extras presentes na PCR utilizando o sistema *two-step*. Na qPCR, esse efeito pode ser visualizado na curva de *melt*, com formação de mais de um pico e também na curva de amplificação. Esse efeito é devido ao conteúdo do tampão (sais e íons) usado na reação de RT ou mesmo a transcriptase reversa. Na qRT-PCR/RT-PCR *one-step* esse efeito é minimizado com a utilização do tampão e enzimas próprios para serem realizados em conjunto com a qPCR ou a PCR. Outros pesquisadores já observaram esse efeito em qPCR/PCR *two-step*. Suslov e Steindler (2005) realizaram experimentos utilizando qRT-PCR *two-step*, com diferentes reagentes e realizando ou não um passo depois da RT de purificação para a retirada de inibidores (restos de íons e sais do tampão utilizado na transcrição reversa, bem como traços da enzima utilizada, a qual pode permanecer ligada ao seu DNA alvo). Os pesquisadores concluíram que o processo de produção de cDNA, dependendo da quantidade de RNA alvo inicial, pode levar à inibição e a ampliações inespecíficas quando o cDNA não é purificado antes da qPCR. Esse efeito pode ter ocorrido neste trabalho, devido à diferença metodológica entre as PCR/qPCR *one* e *two-step*.



**Figura 1.5:** Análise da sensibilidade da qRT-PCR para BVDV (5'-UTR). A qRT-PCR foi realizada utilizando *Master Mix Syber Green One-step* (Applied Biosystem), no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*™. Foi utilizado o plasmídeo recombinante BVDV-1 NADL, linearizado, diluído na base 10 de 1,2 ng a 1,2 ag. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram consideradas positivas as diluições que apresentavam *Ct*. inferior ou igual a 35. Figura 5A mostra a curva de amplificação, sendo o limite de detecção de 1,2 fg. Figura 5B: Curva padrão gerada com *slope* -3,327,  $R^2$  0,997 e eficiência de 99,801%. Figura 5C: Curva de dissociação mostrando a especificidade da reação, todas as diluições estão presentes dentro da curva e a temperatura de dissociação foi de 82,8°C.

### 3.5 Repetibilidade e Reprodutibilidade

A repetibilidade do teste de PCR foi realizada utilizando 10 amostras de sêmen bovino, sendo 2 amostras negativas e 8 positivas, utilizando a qRT-PCR *one-step*. Foram realizadas 3 extrações de cada amostra de sêmen e feitas em triplicata em tubos separados, somando um total de 90 reações, sendo realizada por pessoas diferentes em dias diferentes, para determinar a variabilidade intra e entre os ensaios (Tabela 1.3).

Para todas as amostras negativas não foi detectada a fluorescência. Os controles negativos não apresentaram valor de *Ct*. O coeficiente de variação (CV), fórmula  $CV\% = \text{média } Ct./SD \times 100$ , foi determinado pelo valor do *Ct* de cada amostra, e, foi avaliado intra-ensaios, onde a análise é feita para verificar a variação dentro do mesmo experimento e inter-ensaios, utilizado para verificar a variação entre experimentos diferentes. O CV das análises intra-ensaios variou de 0,11 a 0,23%, e o CV inter-ensaios variou de 0,36 a 0,82%, podendo-se observar que a variação foi pequena entre os experimentos. Para experimentação animal de comparação de técnicas utilizando o CV, a variação oscila de 20-30% (Barbosa & Sampaio, 2010). Podemos observar que a variação do CV é pequena entre os testes e dentro dos testes, sendo assim a qRT-PCR desenvolvida é considerada sensível e com alta repetibilidade.



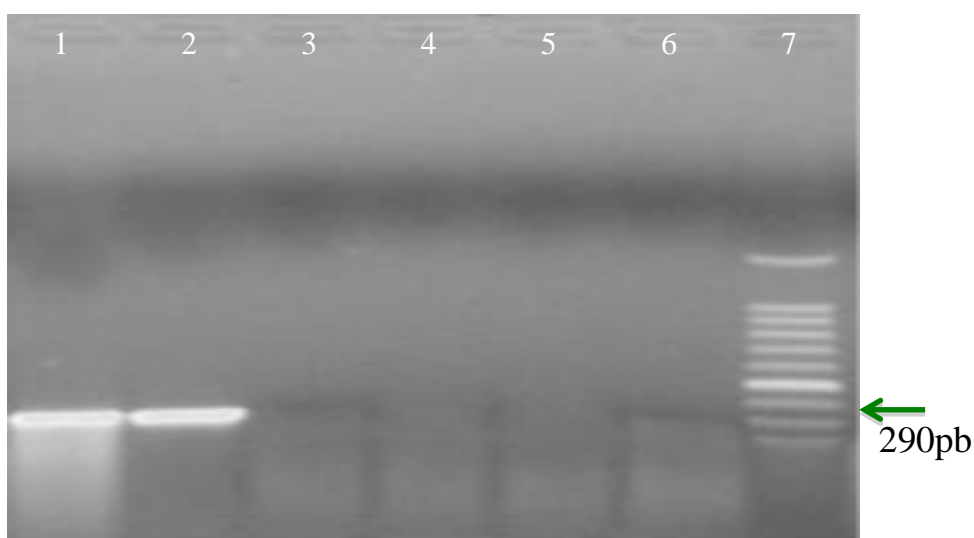
Tabela 1.3 O coeficiente de variação (CV) de cada amostra para análises intra e inter-ensaios.

Número Animal	1°Triplicata	2°Triplicata	3°Triplicata	CV inter-ensaio
<b>4</b>	25.20207024	26.80585289	25.21722031	<b>0.003606414</b>
	26.16350746	27.22911263	26.19878769	
	25.93236923	27.46531296	25.61956215	
	<b>0.019477248</b>	<b>0.012298945</b>	<b>0.019215779</b>	
<b>901</b>	23.77093506	24.3151207	23.17806816	<b>0.006857421</b>
	23.71743393	24.46878242	23.22816467	
	23.98835373	25.19257736	22.72792244	
	<b>0.006022386</b>	<b>0.019002655</b>	<b>0.011954776</b>	
<b>930</b>	29.38221169	24.73600388	25.77467728	<b>0.006763762</b>
	28.46397591	24.77439308	25.59498787	
	29.08943558	24.26228714	25.56927109	
	<b>0.016186282</b>	<b>0.011598971</b>	<b>0.00436354</b>	
<b>444</b>	25.29640007	26.44848061	25.4114418	<b>0.004256431</b>
	25.2442379	26.19482231	25.23374367	
	25.23235703	26.61246109	24.94869995	
	<b>0.001348798</b>	<b>0.007964769</b>	<b>0.009264116</b>	
<b>966</b>	25.00460052	26.26957893	26.24455261	<b>0.005668421</b>
	24.61383629	26.79536057	26.16012383	
	25.1809063	26.80681419	26.17781448	
	<b>0.011639745</b>	<b>0.011527979</b>	<b>0.001699828</b>	
<b>92</b>	26.66784096	26.6661911	28.16103363	<b>0.004385054</b>
	26.68412971	26.46531296	28.07254791	
	26.74077797	27.0088562	28.42581558	
	<b>0.001434001</b>	<b>0.010288318</b>	<b>0.006513842</b>	
<b>23</b>	26.51420784	25.53457069	24.89866447	<b>0.008235168</b>
	26.8406353	25.44882011	23.87893486	
	26.67259407	26.17099953	24.88570404	
	<b>0.006119309</b>	<b>0.015340658</b>	<b>0.023826071</b>	
<b>HVB/01</b>	26.74002838	25.83826065	25.95158958	<b>0.004664697</b>
	26.68101311	25.34022141	25.60510826	
	26.71090889	25.77467728	25.7858696	
	<b>0.001104746</b>	<b>0.010567168</b>	<b>0.006721851</b>	

### 3.6 Especificidade

A RT-PCR foi realizada com iniciadores da região 5'UTR, utilizando o *Kit Access Quick* (Promega), conforme padronização descrita anteriormente. Na figura 1.6 pode-se observar *amplicon* do tamanho esperado de 290 pb para o vírus BVDV-1 NADL.

Houve ainda amplificação no mesmo tamanho de 290 pb para o outro *Pestivirus* de biungulados testado, o vírus da Peste Suína Clássica. Não houve amplificação para os vírus da febre amarela e *Dengue virus* 2 e 3 (estes três pertencentes ao gênero *Flavivirus*).



**Figura 1.6: Teste de especificidade da RT-PCR para BVDV utilizando a região não codificadora 5'(5'- UTR).** Canaleta: 1 BVDV-1; canaleta 2 CSFV; canaleta 3 YFV; canaleta 4 *Dengue virus* 2; canaleta 5 *Dengue virus* 3 canaleta 6 controle negativo e canaleta 7 padrão de tamanho molecular 100pb (Promega).

Como pode ser observado na figura acima, os iniciadores desenhados para a amplificação do BVDV também amplificam o vírus da peste suína clássica, porque a região 5'UTR é uma região muito conservada entre os *Pestivirus*. Pesquisadores têm mostrado que não somente no nível genômico, mas, também em relação aos antígenos, há uma grande similaridade entre os *pestivirus*, porém a amplificação desse vírus não é significativa para o diagnóstico do sêmen bovino. Os testes realizados neste trabalho apresentaram alta sensibilidade, repetibilidade e especificidade para a detecção do BVDV em sêmen, podendo o mesmo ter o seu uso ampliado para outros fluídos biológicos, como sangue e amostras de tecido.

## 2.4 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, L. L.; MIRANDA, I. C. S.; HEIN, H. E.; SANTIAGO NETO, W.; COSTA, E.F.; MARKS, F. S.; RODENBUSCH, C. R.; CANAL, C. W.; CORBELLINI, L. G. Herd-level risk factors for bovine viral diarrhoea virus infection in dairy herds from Southern Brazil. *Research in Veterinary Science*, v.95, p.901–907, 2013.

BAKER, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Veterinary Clinics of North America*, v.11, n.3, p.425-446, 1995.

BARBOSA, I & SAMPAIO, M. Estatística Aplicada a Experimentação Animal. 3ª Edição, 2010.

BAXI, M.; MCRAE, D.; BAXI, S.; GREISER-WILKE, I.; VILCEK, S.; AMOAKO, K.; DEREGT, D. A one-step multiplexed real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. *Vet Microbiol.*, v.25, n.1-3, p.116, 2006.

BOLIN, S. Control of bovine viral diarrhoea virus infection by use of vaccination. *Veterinary Clinics of North America*, v.11, n.3, p.615-626, 1995.

BOLIN, S. R.; GROOMS, D. L. Origin and consequences of bovine viral diarrhoea 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.; RIBEIRO, A. C. C.; MIRANDA, T. M. T.; BARBOSA, A. C. V. C.; BARTHASSON, D. L.; LINHARES, D. C.; FARIA, B. O. Prevalência da infecção pelo vírus da diarréia viral bovina (BVDV) no estado de Goiás, Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, v.39, p.7–19, 2010.

CANAL, C. W.; STRASSER, M.; HERTIG, C.; MASUDA, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and characterization of genomes of BVDV from Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.63, p.85–97, 1998.

CARBONERO, A.; MALDONADO, A.; PEREA, A.; GARCIA-BOCANEGRA, I.; BORGE, C.; TORRALBO, A.; ARENAS-MONTES, A.; ARENAS-CASAS, A. Factores de riesgo del síndrome respiratorio bovino en terneros lactantes de Argentina. *Archivos de Zootecnia*, v.60, p.41–51, 2011.

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

CHEN, Z.; RIJNBRAND, R.; JANGRA, R. K.; DEVARAJ, S.G.; QUL.; MA, Y., et al. Ubiquitination and proteasomal degradation of interferon regulatory factor-3 induced by Npro from a cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Virology*, v.366, n.2, p.277-292, 2007.

COLLETT, M.S. Molecular genetics of pestiviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.15, n.3, p.145-154, 1992.

DONIS R. O. Molecular biology of bovine viral diarrhoea virus and its interactions with the host. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, v.11, p.393-423, 1995.

FERREIRA, L. C. L.; FLORES, E. F.; DRIEMEIER, D.; MELO, O.; LEMOS, R. A. A. Doença das mucosas associada à dermatite generalizada em bovinos, Mato Grosso do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.6, p.285-292, 2008.

FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL F.S.F.; ROEHE, P. M.; ALFIERI, A. A.; PITUCO E. M. A infecção pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) no Brasil-histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.25. p.25-134, 2005.

FRANDOLOSO, R.; ANZILIERO, D.; SPAGNOLO, J.; KUSE, N.; FIORI, C.; SCORTEGAGNA, G. T.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C. Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v.9, p.1102–1106, 2008.

FULTON R. W.; RIDPATH J. F.; CONFER A.W.; SALIKI J. T.; BURGE L. T.; PAYTON, M.E.. Bovine viral diarrhea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programmers. *Biol.*, v.31, p.89-95, 2003.

GIBBS, E. P. J.; LAWMAN, M. J. P.; HERNIMAN, K. A. J. Preliminary observations on transplacental infection of bluetongue virus in sheep – A possible overwintering mechanism. *Research of Veterinary Sciences*, v.27, p.118–120, 1979.

GILLESPIE, J.; BAKER, L.; McENTEE, K. A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. *Cornell Veterinary*, v.50, p.73-79, 1960.

GIVENS, M. D.; RIDDELL, K. P.; EDMONDSON, M. A.; WALZ, P. H.; GARD, J. A.; ZHANG, Y.; GALIK, P. K.; BRODERSEN, B. W. ; CARSON, R. L. ; STRINGFELLOW, D. A. Epidemiology of prolonged testicular infections with bovine viral diarrhea virus. *Vet Microbiol.*, v.139, n.1-2, p.42-51, 2009.

GONG, Y.; TROWBRIDGE, R.; MACNAUGHTON, T. B.; WESTAWAY, E. G.; SHANNON, A.D.; GOWANS, E. J. Characterization of RNA synthesis during a one-step growth curve and of the replication mechanism of bovine viral diarrhea virus. *Journal of General Virology*, v.77, p.2729-2736, 1996.

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

GRUMMER, B.; GROTHA, S.; GREISER-WILKE, I. J. Bovine viral diarrhea virus is internalized by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*, v10, p.427-432, 2004

GUARINO, H.; NÚÑEZ, A.; REPISO, M. V.; GIL, A.; DARGATZ, D. A. Prevalence of serum antibodies to bovine herpesvirus-1 and bovine viral diarrhea virus in beef cattle in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, v.85, p.34–40, 2008.

HARKNESS, J. W.; VAN DER LUGT, J.J. (Eds.). (1994). *Bovine viral diarrhea and mucosal disease*. In COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infectious Diseases of Livestock*. Cape Town: Oxford University Press.

HOUE, H. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. *Veterinary Clinics of North America*, v.11, n. 3, p.521-548, 1995.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. *Vet Microbiol.*, v.64, n.2-3, p.89-107, 1999.

KAMEYAMA, K.I.; SAKODA, Y.; MATSUNO, K.; ITO, A.; TAJIMA, M.; NAKAMURA, S.; KIDA, H. Cleavage of the NS2-3 protein in the cells of cattle persistently infected with non-cytopathogenic bovine viral diarrhea virus. *Microbiology and Immunology*, v.52, p.277-82, 2008.

KIRKLAND, P.D.; MCGOWAN, M.R.; MACKINTOSH, S.G.; MOYLE, A. Insemination of cattle with semen from a bull transiently infected with pestivirus. *Vet. Rec.*, v.140, p.124-127, 1997.

KREY, T.; HIMMELREICH, A.; HEIMANN, M.; MENGE, C.; THIEL, H. J.; MAURER, K.; RÜMENAPF, T. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol.*, v.80, n.8, p.3912-3922, 2006.

LEE, S. R.; NANDURI, B.; PHARR, G. T.; STOKES, J. V.; PINCHUK, L. M. Bovine viral diarrhea virus infection affects the expression of proteins related to professional antigen presentation in bovine monocytes. *Biochim Biophys Acta*, v.1794, n.1, p.14-22, 2009.

LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M.: 2001, Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Fields virology*, ed. Knipe DM, Howley PM, 4th ed., pp. 991-1041. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

LINDBERG, A.; HOUE, H. Characteristics in the epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) of relevance to control. *Prev Vet Me.*, v.72, n.1-2, p.55-73, 2005.

LIU, L.; XIA, H.; WAHLBERG, N.; BELÁK, S.; BAULE, C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology*, v.385, p.351-357, 2009.

MARLEY, M.S.; TABOR, J.M.; GIVENS, M.D.; KAPROTH, M.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P. K.; ZHANG, Y.; EASON, A.B. Bovine viral diarrhea virus is inactivated when whole milk from persistently infected cows is heated to prepare semen extender. *Vet Microbiol.*, v.134, n.3-4, p.249-253, 2009.

MAURER, K.; KREY, T.; MOENNIG, V.; THIEL, H. J.; RUMENAPF, T. CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus. *J Virol.*, v.78, n.4, p.1792-1799, 2004.

McCLURKIN, A. W.; LITTLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; FRANK, G.H.; CORIA, M.F.; BOLIN, S.R. Production of cattle immunotolerant to BVD virus. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.48, p.156-161, 1984.

- McGOWAN, M.R.; KAFI, M.; KIRKLAND, P.D.; KELLY, R.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; OCCHIO, M.D.; JILLELLA D. Studies of the pathogenesis of bovine pestivirus-induced ovarian dysfunction in superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, v.59, n.3-4, p.1051-1066, 2003.
- NISKANEN, R.; EMANUELSON, U.; SUNDBERG, J.; LARSSON, B.; ALENIUS, S. Effects of infection with bovine virus diarrhoea virus on health and reproductive performance in 213 dairy herds in one county in Sweden. *Preventive Veterinary Medicine*, v.23, p.229–237, 1995.
- OLAFSON, P.; MACCALLUM, A. D.; FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. *Cornell Veterinary*, v.36, p.205-213, 1946.
- PASSLER, T.; WALZ, P.H.; DITCHKOFF, S.S.; BROCK, K.V.; DEYOUNG, R.W.; FOLEY, A. M.; DANIEL GIVENS, M. Cohabitation of pregnant white-tailed deer and cattle persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus results in persistently infected fawns. *Vet Microbiol.*, v.134, n.3-4, p.362-367, 2009.
- PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. *Veterinary Record*, v.142, p.385–391, 1998.
- PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J.; TUSSEN, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, v.203, n.2, p.260-268, 1994.
- PETERHANS, E.; JUNGI, T. W.; SCHWEIZER, M. BVDV and innate immunity. *Biologicals*, v.31, n.2, p.107-112, 2003.
- PINCHUK, G. V.; LEE, S. R.; NANDURI, B.; HONSINGER, K. L.; STOKES, J. V.; PINCHUK, L. M. Bovine viral diarrhoea viruses differentially alter the expression of the protein kinases and related proteins affecting the development of infection and anti-viral mechanisms in bovine monocytes. *Biochim Biophys Acta*, v.1784, n.9, p.1234-1247, 2008.
- POLETO, R.; KREUTZ, L. C.; GONZALES, C. J.; BARCELLOS, L. J. G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciência Rural*, v.34, p.595–598, 2004.
- POTGIETER, L. N. D. *Bovine viral diarrhoea and mucosal disease*. In COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infectious Diseases of Livestock* (2 ed. Vol. 2). Cape Town: Oxford University Press.
- QUINCOZES, C. G.; FISHER, G.; HUBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T.; BROD, C. S. 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, p.269–276, 2007.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal Hygiene*, v.27, n.3, p.493-497, 1938.

- RIDPATH, J. F.; BOLIN, S. R.; DUBOVI, E. J. Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology*, v.206, n.1, p.66-74, 1994.
- RIDPATH, J. F. Classification and Molecular Biology. In: GOYAK, S. M.; RIDPATH, J. F. *Bovine Viral Diarrhea Virus Diagnosis, Management and Control*. Ames: Blackwell Publishing, 2005. p. 65-80.
- RIDPATH, J. F.; BENDFELDT, S.; NEILL, J. D.; LIEBLER-TENORIO, E. Lymphocytopenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res.*, v.118, p.62–69, 2006.
- RIKULA, U.; NUOTIO, L.; LAAMANEN, U.I.; SIHVONEN, L. Transmission of bovine viral diarrhea virus through the semen of acutely infected bulls under field conditions. *Vet. Rec.*, v.19, p.79-82, 2008.
- ROCHA, M.A.; BARBOSA, E.F.; GUIMARÃES, S.E.; DIAS NETO, E.; GOUVEIA, A.M. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet Microbiol.*, v.63, n.1, p.1-11, 1998.
- RODRÍGUEZ, J.M.; YÁÑEZ, R.J.; RODRÍGUEZ, J.F.; VIÑUELA, E.; SALAS, M.L. The DNA polymerase-encoding gene of African swine fever virus: sequence and transcriptional analysis. *Gene*, v-136, n.1-2, p.103-110, 1993.
- RONECKER, S.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; GREISER-WILKE, I.; GRUMMER, B. Formation of bovine viral diarrhea virus E1-E2 heterodimers is essential for virus entry and depends on charged residues in the transmembrane domains. *Journal of General Virology*, v.89, p.2114-2121, 2008.
- STAHL, K.; KAMPA, J.; ALENIUS, S.; PERSSON WADMAN, A.; BAULE, C.; AIUMLAMAI, S.; BELÁK, S. Natural infection of cattle with an atypical “Hobi”- like pestivirus implications for BVD control and for the safety of biological products. *Veterinary Research*, v.38, p.517-523, 2007.
- STAHL, K.; LINDBERG, A.; RIVERA, H.; ORTIZ, C.; MORENO-LOPEZ, J. Self-clearance from BVDV infections – a frequent finding in dairy herds in an endemically infected region in Peru. *Preventive Veterinary Medicine*, v.83, p.285–296, 2008.
- ST-LAURENT, G.; MORIN, G.; ARCHAMBAULT, D. Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.658–665, 1994.
- SUSLOV, O.; STEINDLER, D.A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Research*, v.33, n.20, p.181, 2005.
- TAUTZ, D; RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.*, v.132. n.1, p.14-19, 1983.
- TAUTZ, N.; MEYERS, G.; THIEL, H. J. Pathogenesis of mucosal disease, a deadly disease of cattle caused by a pestivirus. *Clinical and Diagnostic Virology*, v.10, p.121– 127, 1998.

THIEL, H. J.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Pestiviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. (Org.) *Fields Virology*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Co., 1996. p. 1059-1074.

THOBOKWE, G.; HEUER, C.; HAYES, D. P. Validation of a bulk tank milk antibody ELISA to detect dairy herds likely infected with bovine viral diarrhoea virus in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, v.52, p.394–400, 2004.

THOMPSON, J. A.; LEITE, R. M. R; Gonçalves, V. S.; Leite, R. C.; Bandeira, D. A.; Herrmann, G. P.; Moreira, E. C.; Prado, P. E.; Lobato, Z. I. P; BRITO, C. P.; Lage, A. P. 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, p.290–301, 2006.

TSCHERNE, D.M.; EVANS, M.J.; MACDONALD, M.R.; RICE, C. M. Transdominant inhibition of bovine viral diarrhea virus entry. *J Virol.*, v.82, n.5, p.2427-2436, 2008.

VAN OIRSCHO, T J.T.; BRUSCHKE, C.J.M.; VAN RIJN P.A. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea. *Vet. Microbiol.*, v.64, p.169-183, 1999.

VIDOR, T. Isolamento e identificação do vírus da doença das mucosas no estado do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor*, v. 5, p.51-58, 1974.

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; PATON, D.J. Genetic diversity of BVDV: consequences for classification and molecular epidemiology. *Prev Vet Med.*, v.72, n.1-2, p.31-35, 2005.

ZHANG, N.; LIU, Z.; HAN, Q.; QIU, J.; CHEN, J.; ZHANG, G.; LI, Z.; LOU, S.; LI, N. Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. *Virol J.*, v.29, n.8, p.374, 2011.

YAN, L.; ZHANG, S.; PACE, L.; WILSON, F.; WAN, H.; ZHANG, M. Combination of Reverse Transcription Real-Time Polymerase Chain Reaction and Antigen Capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with *Bovine viral diarrhea virus*. *J Vet Diagn Invest.*, v.23, p.16-25, 2011.

WARRILOW, D.; LOTT, W.B.; GREIVE, S.; GOWANS, E.J. Properties of the bovine viral diarrhea virus replicase in extracts of infected MDBK cells. *Arch Virol.*, v.145, p.2163-2171, 2000.

WIEDMANN, M.; BRANDON, R.; WAGNER, P.; DUBOVI, E.J.; BATT, C.A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J.Virol. Methods*, v.44, p.129–140, 1993.



### RESUMO

*Bluetongue virus* (vírus da língua azul- BTV) é um agente viral não contagioso, de notificação obrigatória, transmitido por insetos hematófagos. Geralmente a infecção em bovinos é subclínica, porém devido à associação do vírus a hemácias, a viremia é prolongada podendo durar meses. Dependendo do sorotipo do BTV envolvido na infecção, podem ocorrer graves distúrbios reprodutivos incluindo morte embrionária precoce, abortos, má formação congênita, infertilidade temporária em touros e a eliminação do BTV no sêmen. Amostras de sêmen congeladas estão sendo usadas com frequência na inseminação artificial no rebanho para melhoramento genético, e conseqüentemente tornou-se necessário o controle sanitário para evitar a disseminação de patógenos transmitidos via sêmen, como o BTV. O objetivo desse trabalho foi a otimização da técnica de RT-PCR e qRT-PCR, *one-step* e *two-step*, utilizando iniciadores que amplificam parte do gene do seg-10 que codifica a proteína não estrutural 3-NS3 que é altamente conservada. A sensibilidade analítica da RT-PCR *one-step* para o vírus BTV-4 em cultivo celular foi de  $6,3 \cdot 10^{-2}$ TCID<sub>50</sub>/50µL e para o sêmen experimentalmente contaminado foi de  $6,3 \cdot 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/50µL. A sensibilidade analítica da RT-PCR *two-step*, foi  $6,3 \cdot 10^{-4}$ TCID<sub>50</sub>/50µL para BTV-4 em cultivo celular e  $6,3 \cdot 10^{-2}$ TCID<sub>50</sub>/50µL para sêmen experimentalmente contaminado com BTV-4. A qRT-PCR foi realizada utilizando os mesmos iniciadores. O limite de detecção da fluorescência na qRT-PCR foi de  $6,3 \cdot 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/50µL tanto para o BTV-4 em cultivo de célula, quanto em sêmen experimentalmente contaminado, utilizando RNA como molde para a qRT-PCR *one-step*. A sensibilidade analítica da qRT-PCR *two-step*, foi de  $6,3 \cdot 10^{-4}$ TCID<sub>50</sub>/50µL para BTV-4 tanto em cultivo celular quanto para sêmen experimentalmente contaminado, utilizando cDNA produzido como molde. A região gênica trabalhada no desenvolvimento do teste diagnóstico é conservada para o BTV, não permitindo a caracterização dentre os diferentes sorotipos. O coeficiente de variação (CV) foi determinado pelo valor do *Ct* de cada amostra. O CV das análises intra-ensaios variou de 0,21 a 3,4% e o CV inter-ensaios variou de 0,29 a 1,8% entre as amostras. A existência de restrição à exportação de sêmen positivo para BTV ressalta a importância dos testes aqui descritos.

**Palavra-chave:** RT-PCR, qRT-PCR, BTV, sêmen, bovino

## ABSTRACT

*Bluetongue virus* (BTV) is a non-contagious viral agent, with mandatory notification, transmitted by haematophagous insects. Usually the infection is subclinical in cattle, however due to virus-cell association of BTV, the viraemia is prolonged and may last for several months. Depending on the type involved in the infection, severe reproductive disorders can occur including early embryonic death, abortion, congenital malformation, temporary infertility in bulls and shedding of BTV by semen. Frozen semen samples are being frequently used in artificial insemination for herd genetic improvement. Consequently, herd health control measurements became essential in order to prevent the spread of pathogens, such as BTV, via semen. The aim of this study was to optimize the RT-PCR technique and qRT-PCR, one-step and two-step, using primers that amplify part of the seg-10 gene that encodes the high conserved nonstructural protein 3- NS3 protein. The analytical sensitivity of RT-PCR one-step to BTV-4 virus in cell culture was  $6,3 \cdot 10^{-2}$ TCID<sub>50</sub>/50µL and  $6,3 \cdot 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/50µL for semen experimentally contaminated. The analytical sensitivity of RT-PCR two-step was  $6,3 \cdot 10^{-4}$ TCID<sub>50</sub>/50µL for BTV-4 in cell culture and  $6,3 \cdot 10^{-2}$ TCID<sub>50</sub>/50µL for semen experimentally contaminated with BTV-4. The qRT-PCR was performed using the same primers. The limit detection of the fluorescence of the qRT-PCR was  $6,3 \cdot 10^{-1}$ TCID<sub>50</sub>/50µL for both BTV-4 cell culture and experimentally contaminated semen using RNA as template for qRT-PCR one-step. The analytical sensitivity of the qRT-PCR two-step was  $6,3 \cdot 10^{-4}$ TCID<sub>50</sub>/50µL of BTV-4 for both studied cell culture and semen experimentally contaminated, using cDNA as template. The gene region as a diagnostic test did not allow the differentiation among serotypes. The coefficient of variation (CV) was determined by the Ct value for each sample. The CV intra-assay analysis ranged from 0,21 to 3,4 % and the inter-assay CV ranged from 0,29 to 1,8% among samples. The existence of restriction on exporting semen positive for BTV highlights the importance of the tests described here.

**Keyword: RT-PCR, qRT-PCR, BTV, semen, bovine**

## CAPÍTULO 2 *Bluetongue virus*

### 1 Revisão

#### 1.1 Introdução

O *Bluetongue virus* (BTV) é capaz de infectar naturalmente uma variedade de ruminantes domésticos e selvagens, incluindo ovinos, caprinos, bovinos, bubalinos, camelídeos, cervídeos e outros herbívoros, como os elefantes. A incidência da doença clínica é altamente variável. A doença clínica é mais comum nos ovinos e cervídeos. O BTV pode causar doença grave em ovinos e em alguns cervídeos, mas raramente causa doença em bovinos, caprinos e na maioria dos ruminantes selvagens. Embora a infecção nos bovinos seja de grande importância epidemiológica, a infecção nesta espécie é geralmente subclínica. A taxa de mortalidade e a gravidade dos sinais clínicos são influenciadas pela espécie, raça e idade do animal infectado, pelo status imunológico do animal, pelo sorotipo e amostra do BTV e por interações com o meio ambiente. Em bovinos os surtos são esporádicos, a morbidade variável (geralmente em torno de 5%) e a mortalidade muito baixa ou nula (Lobato, 1999). Um fato a ser destacado, entretanto, foi a emergência do BTV-8 na Europa em 2006, especialmente na Bélgica, Alemanha, França, Luxemburgo e Holanda. O vírus rapidamente se espalhou para o restante da Europa nos anos subsequentes (Zientara & Sánchez-Viscaíno, 2013). Este surto foi marcado pela ocorrência de teratogênese nos fetos, além de alta frequência de sinais clínicos na espécie bovina, mostrando a necessidade de se estender os programas de controle de pequenos ruminantes para os bovinos (Anderson *et al.*, 2013).

As principais consequências da infecção pelo BTV, tanto para bovinos quanto para ovinos, são as perdas indiretas devido ao aborto, à queda do desempenho reprodutivo, à perda de condição corporal e à queda na produção de leite (para bovinos). A restrição ao mercado animal internacional e seus germoplasmas, entretanto, é uma das causas mais importantes de perda econômica relacionada ao BTV (Aradaib *et al.*, 2005).

#### 1.2 Etiologia

A Língua Azul é uma doença viral, não contagiosa, transmitida por dípteros do gênero *Culicoides*, que afeta ruminantes domésticos e selvagens. O vírus da língua azul é um *Orbivirus* pertencente à família *Reoviridae*, similar morfológicamente a outros orbivírus como o *African horse sickness virus*, *Epizootic hemorrhagic disease virus* e *Equine encephalosis virus*. O genoma do BTV é constituído por 10 segmentos de RNA de fita dupla, sete codificantes de proteínas estruturais (VP1-VP7) e três de proteínas não estruturais (NS1-NS3a e NS3b) (Belhouchet *et al.*, 2011; Ratinier *et al.*, 2011).

A proteína externa do capsídeo é formada pela proteína VP5 (Nason *et al.*, 2004) que é o principal determinante da especificidade do sorotipo (Inumaru *et al.*, 1987; Oldfield *et al.*, 1990; Anthony *et al.*, 2007; Maan *et al.*, 2010), junto com a VP5. Até o momento 26 sorotipos foram identificados no mundo (Roy & Noad, 2006; Schwartz-Cornil *et al.*, 2008; Maan *et al.*, 2012). Além dos sorotipos já mencionados foram descritos o BTV 25 e 26, isolados na Suíça e Kuwait, respectivamente (Hofmann *et al.*, 2008; Chaignat *et al.*, 2009; Maan *et al.*, 2011). Não se sabe exatamente como os diferentes sorotipos se manifestam clinicamente.

### 1.3 Histórico

O BTV foi descrito pela primeira vez na África do Sul (Spreull, 1905; Henning, 1956). O nome língua azul refere-se à descrição da língua cianótica de alguns animais afetados. Esta doença foi reconhecida posteriormente nos Estados Unidos, Península Ibérica e Oriente Médio, Ásia e sul da Europa (Verwoerd & Erasmus, 2004). Atualmente, é evidente que a infecção pelo BTV ocorre no mundo todo e em todos os climas: tropical, subtropical e algumas regiões temperadas. A primeira referência de Língua Azul no Brasil data de 1978 (Silva, 1978), quando foi relatada à Organização Mundial de Saúde Animal a primeira evidência sorológica da ocorrência dessa doença no país. Esse relato representou também a primeira evidência do BTV na América do Sul (Lager, 2004). Em 1980, oito de um total de 60 bovinos exportados do Brasil para os Estados Unidos desenvolveram anticorpos contra o BTV (sorotipos 4 e 20) durante o período de quarentena e, a partir de um dos animais, o vírus foi isolado (sorotipo 4) (Grocock & Campbell, 1982). A partir dessa data, vários levantamentos sorológicos, incluindo diferentes espécies de ruminantes domésticos e selvagens, têm evidenciado a presença de reação positiva para o BTV em vários estados brasileiros, incluindo Paraíba (Melo *et al.*, 2000), Minas Gerais (Castro *et al.*, 1992; Lage *et al.*, 1996; Konrad *et al.*, 2004), Rio de Janeiro, Sergipe, São Paulo, Paraná, Santa Catarina (Lager, 2004), Rio Grande do Sul (Costa *et al.*, 2006) e Mato Grosso do Sul (Tomich *et al.*, 2009), sem, contudo serem detectadas manifestações clínicas. Em 2001, foi confirmado um foco da doença no estado do Paraná, envolvendo 130 ovinos, quatro caprinos e 70 bovinos soropositivos. Desses animais, oito ovinos e um caprino apresentaram sinais clínicos da doença (Laender, 2002; Lager, 2004), sendo a primeira confirmação da ocorrência de sinais clínicos da doença no país e na América do Sul.

### 1.4 Transmissão

O BTV é quase sempre transmitido por mosquitos do gênero *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) e, portanto, surtos dependem da presença desses vetores e ruminantes susceptíveis. Os *Culicoides* incluem até a presente data 1300 a 1400 espécies (Mellor *et al.*, 2000; Borkent, 2005), mas apenas cerca de 30 deles são considerados vetores (Meiswinkel, 2004). São mais facilmente encontrados em áreas quentes, úmidas e lamacentas que são ricas em matéria orgânica. Ao sugar o sangue de ruminantes infectados, os mosquitos adquirem o BTV, que replica em seu trato digestivo. Além dos mosquitos, o BTV foi isolado a partir de algumas espécies de carrapatos (Stott *et al.*, 1985; Bouwknecht *et al.*, 2010). Sêmen de touro também pode transmitir o vírus, mas somente durante o período de viremia (Bowen & Howard, 1984; Howard *et al.*, 1985; Osburn, 1994; Kirkland *et al.*, 2004). É importante ressaltar a importância da transmissão via sêmen, pois a viremia do BTV no touro é muito prolongada, sendo importante fonte de contaminação para fêmeas através da monta natural e inseminação artificial.

A passagem do BTV através da placenta já havia sido mostrada como modo de transmissão em bovinos (Gibbs *et al.*, 1979; Thomas *et al.*, 1986; De Clercq *et al.*, 2008; Desmecht *et al.*, 2008; Menzies *et al.*, 2008; Backx *et al.*, 2009; Darpel *et al.*, 2009; Lewerin *et al.*, 2010; Santman-Berends *et al.*, 2010). Em um estudo experimental foi ainda possível infectar um bezerro recém-nascido com colostro contaminado com BTV (Backx *et al.*, 2009). A transmissão com colostro também foi relatada por Mayo *et al.* (2010).

Durante a recente introdução do BTV-8 na Europa ocorreu grande número de abortos em ruminantes. Em estudos de infecção experimental com esta amostra de BTV-8 foi demonstrada a habilidade deste subtipo em cruzar a barreira placentária no início do segundo terço da gestação. Comprovou-se a transmissão transplacentária em 33% das cabras infectadas experimentalmente até o dia 61 da gestação (Belbis *et al.*, 2013). Em outro estudo também com o BTV-8 isolado na Bélgica, onde a soroprevalência aumentou de 1,3 a 88% somente no ano de 2007, calculou-se o impacto reprodutivo em rebanhos ovinos primariamente infectados, e, sem proteção vacinal, onde se observou a ocorrência de abortos em 25% dos animais nos rebanhos avaliados, e, queda da fertilidade em 50% (Saergeman *et al.*, 2011).

Para melhorar o conhecimento sobre a capacidade de cruzar a barreira transplacentária e verificar o impacto da vacinação com vírus vivo modificado na Itália, Savini e colaboradores (2014) avaliaram em um estudo retrospectivo, baço e cérebro de fetos de 663 ovinos, 429 bovinos, 155 caprinos e 17 búfalos. Os autores isolaram o BTV-2 e BTV-9 vacinais em 2,4% das amostras de ovinos, 1,4% das provenientes de bovinos e 0,6% das de caprinos. Foi ainda verificado que o BTV-9 (n=28) foi mais frequentemente isolado que o BTV-2 (n=3), e, que ambos foram hábeis não somente em cruzar a barreira transplacentária nestas espécies destacadas, bem como causar aborto e má formação fetal.

## 1.5 Patogenia

Após a inoculação do vírus através de picada de um vetor infectado com BTV o vírus migra para o linfonodo regional (MacLachlan, 2004). O vírus é levado através dos vasos linfáticos para todo o corpo do animal. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) representam a população de células alvo capaz de transportar o vírus aos locais secundários de replicação (Whetter *et al.*, 1989; Barratt-Boyes *et al.*, 1992). A multiplicação do BTV ocorre principalmente em fagócitos mononucleares e células endoteliais e este evento é seguido por uma liberação abundante de vírus para a corrente sanguínea (MacLachlan *et al.*, 1990; Barratt-Boyes & MacLachlan, 1994).

A detecção de RNA do BTV nas células do sangue dura até 140-160 dias após a infecção, um intervalo correspondente ao tempo de vida dos eritrócitos bovinos (Katz *et al.*, 1994; MacLachlan *et al.*, 1994). Vários estudos em bovinos naturalmente ou experimentalmente infectados com BTV confirmaram que as partículas virais infecciosas no sangue podem ser isoladas por um período consideravelmente mais curto em comparação com a detecção de RNA viral (MacLachlan *et al.*, 1994; Singer *et al.*, 2001; Bonneau *et al.*, 2002).

Em bovinos a doença clínica é rara (Tweedle & Mellor, 2002) com exceção da infecção pelo BTV-8 em que os sinais clínicos se manifestam em um grande número de animais (Elbers *et al.*, 2008). Os estágios iniciais são caracterizados por apatia, febre e depressão seguida de erosão e necrose da mucosa oral e nasal, corrimento nasal, salivação excessiva, claudicação, conjuntivite, dermatite ulcerativa, diarreia ocasional sanguinolenta, edema e hiperemia. A pele dos tetos muitas vezes está inflamada e pode rachar e descascar (Tweedle & Mellor, 2002; Thiry *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2008; Elbers *et al.*, 2008, 2009). Ordenhar vacas com essas lesões pode acarretar em perda da produção leiteira (Thiry *et al.*, 2006; Mehlhorn *et al.*, 2008; Elbers *et al.*, 2009). A infecção da vaca em estágios iniciais de gestação pode resultar em morte prematura e reabsorção do embrião; outras consequências envolvem aborto ou o nascimento de bezerras fracas e com má formação (MacLachlan *et al.*, 2000; Desmecht *et al.*, 2008; Savini *et al.*, 2014).

## 1.6 Diagnóstico

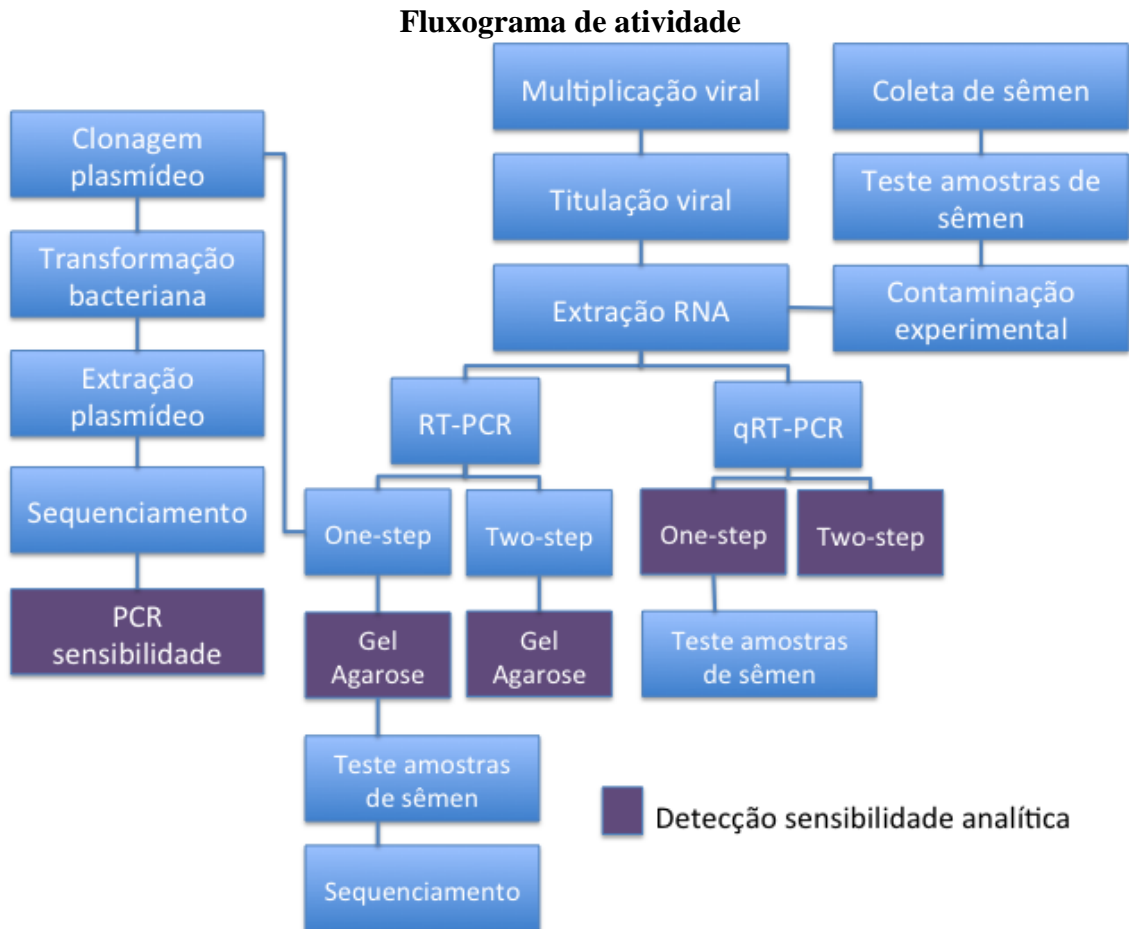
Deve-se suspeitar de língua azul quando os sinais clínicos característicos da doença forem observados em ovinos e bovinos, principalmente nas estações de maior atividade dos vetores. O diagnóstico é baseado em sinais clínicos, dados epidemiológicos e confirmado por exame laboratorial. As amostras a serem analisadas no laboratório devem incluir sangue total e amostras *post-mortem* de tecido de baço, nódulos linfáticos, fígado, pulmões, medula óssea, e, além disso, o tecido cerebral e do baço de fetos (Stott *et al.*, 1983; Tweedle & Mellor, 2002; Savini *et al.*, 2014). O diagnóstico sorológico da infecção pelo BTV é baseado principalmente nas técnicas de IDGA e ELISA, e, também pode ser realizado o isolamento viral para a detecção do vírus. O teste *in vitro* considerado mais sensível é a inoculação intravenosa em ovos embrionados, seguida do cultivo em células BHK (*Baby hamster kidney cell*), outra célula utilizada para o isolamento do vírus é a célula de inseto KC. A RT-PCR é um método que permite a diferenciação entre os sorotipos (Katz *et al.*, 1994; MacLachlan *et al.*, 1994; Mertens *et al.*, 2007, Maan *et al.*, 2011.), além da detecção do BTV de modo mais eficiente, comparado ao isolamento viral, que é uma técnica particularmente laboriosa e de baixa sensibilidade. Outra maneira de se realizar a sorotipagem é através da imunofluorescência direta (IFD) e a SN, utilizando-se uma bateria de soros dos 26 sorotipos existentes. Porém, além de ser um teste caro e demorado (Reddington *et al.*, 1991; Hamblin, 2004), poucos laboratórios mundiais têm acesso a este painel de antissoros.

## 1.7 Controle

Imunização profilática através de vacinas e o controle de vetores são fatores importantes para o controle de BTV no rebanho. A vacinação interrompe o ciclo de BTV no ambiente, que, portanto, reduz as perdas econômicas. É importante destacar, entretanto, que a vacinação deve ser sorotipo-específica (Bhanuprakash *et al.*, 2009) e, portanto, antes da utilização deve-se saber o sorotipo circulante na região. Dois tipos de vacinas, atenuada e inativada, estão atualmente disponíveis. Uma dose de vacina atenuada é suficiente para proporcionar uma boa proteção por pelo menos um ano e pode fornecer proteção contra infecção com outro sorotipo de BTV, porém, com a eficiência diminuída (Tweedle & Mellor, 2002). Vacinas inativadas podem induzir imunidade com proteção duradoura, mas, exigem revacinação (Savini *et al.*, 2008, 2009). É importante destacar que a vacinação com vacina viva modificada de BTV-2 e BTV-9 mostrou que estes subtipos foram hábeis em cruzar a barreira transplacentária e induzir aborto e má formação em bovinos, ovinos e caprinos (Savini *et al.*, 2014). Essas vacinas podem prevenir o desenvolvimento da doença clínica em hospedeiros susceptíveis, reduzir as perdas econômicas diretas devido à infecção, facilitar o comércio seguro de animais e prevenir o desenvolvimento de viremia (Bhanuprakash *et al.*, 2009). A associação de vacinas com o controle dos vetores são as principais medidas para controle da doença nos rebanhos. No Brasil ainda não temos vacina comercial disponível e o controle de BTV no rebanho fica dificultado, especialmente porque em nosso país os dados de prevalência do BTV são incipientes, além da ausência do conhecimento sobre o(s) sorotipo(s) circulante e o impacto econômico da infecção, tornando o diagnóstico e a sorotipagem do BTV cruciais para a instalação de bons programas de controle.

Devido à grande circulação do BTV no Brasil e da importância da disseminação deste vírus via sêmen, este trabalho objetivou o desenvolvimento de testes diagnósticos utilizando RT-PCR e qRT-PCR para esta triagem, além da caracterização dos subtipos circulantes no estado de Minas Gerais, a partir de sêmen de animais assintomáticos.

## 2 Material e Métodos



### 2.1 Vírus referência e Titulação viral

O vírus de referência usado foi o BTV sorotipo 4 (BTV-4), gentilmente cedido pelo Panaftosa, multiplicado em linhagem celular BHK-21 (*Baby Hamster Kidney* ATCC CCL-10). A titulação viral foi realizada utilizando-se a célula BHK-21, em placas de 96 poços (Corning), adicionando 50.000 células por cm<sup>2</sup> com meio DMEM (Sigma-Aldrich) e 5% de SFB (GIBCO), incubação por 24 horas à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific). Após a monocamada celular apresentar confluência de aproximadamente 90%, foi feita a diluição seriada na base 10 do vírus BTV-4 e adicionou-se 50 µL de cada diluição nas oito replicatas de cada coluna da placa. Após a adsorção viral por uma hora à temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific), foi adicionado 100 µL de meio DMEM (Sigma-Aldrich) com SFB (GIBCO) na concentração final de 2,5%, e retornou-se às condições iniciais de incubação. Observou-se diariamente o efeito citopático na monocamada celular até o tempo final de 96 horas. O cálculo final da titulação viral foi realizado através do método de Reed & Muench (1938).

## 2.2 Extração do RNA viral

O RNA da amostra de referência BTV-4 foi extraído utilizando o Tri-reagente (Sigma-Aldrich), em alíquotas de BTV-4 diluído em PBS com volume total de 500 µL, adicionando-se 1 mL do reagente acima citado. Após a homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 5 minutos, foi adicionado 200 µL de clorofórmio 100% (Merck). Após agitação vigorosa por 15 segundos com as mãos, os microtubos foram incubados à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 15 minutos a 4°C, sendo obtida uma mistura trifásica, uma fase aquosa transparente superior, uma interfase branco-leitosa e uma fase vermelho claro inferior (fenol-clorofórmio). Transferiu-se a fase aquosa para um microtubo de 1,5 mL e o RNA foi precipitado adicionando-se 500 µL de álcool isopropílico (Merck). Incubaram-se as amostras por 10 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se uma etapa de centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Lavou-se o sedimento contendo o RNA com 1mL de álcool etílico 75% (Merck) e centrifugou-se a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi secado ao ar brevemente, e, eluído em 20 µL de água livre de nuclease, com posterior adição de 0,93 µL de *RNasin* (Promega), seguido da incubação das amostras a 56°C por 10 minutos e armazenamento a -80°C.

## 2.3 Iniciadores e otimização da RT-PCR

Foram utilizados iniciadores que amplificam parte do gene que codifica a proteína não estrutural NS3 que é altamente conservada entre os 26 sorotipos, já anteriormente desenhados e testados pelos Laboratórios de Pesquisa em Virologia Animal da Escola de Veterinária e o Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Como para os outros ensaios desenvolvidos, foram realizadas análises *in silico* das sequências completas e parciais depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e provenientes de diferentes regiões do mundo. Iniciadores e localização na sequência utilizada para conferência dos mesmos estão apontados na Tabela 2.1. Os iniciadores utilizados como normalizadores foram os mesmos descritos para o BVDV (secção 2.3 do capítulo1)

**Tabela 2.1** Iniciadores, orientação, localização e tamanho esperado do *amplicon* de parte do gene que codifica a proteína não estrutural NS3 do BTV-4.

Iniciadores	Vírus – Acesso no <i>GenBank</i> e posição	<i>Amplicon</i>
Antisenso 5' gcgtacgatgcgaatgcagc 3'	BTV-4 (AY426602) (8-264)	256pb
Senso 5' agtgtcgCtgccatgCtattc 3'	BTV-4 (AY426602) (8-264)	256pb

Para a otimização da RT-PCR *one-step* foram testadas quantidades variáveis de RNA, a temperatura de anelamento e a concentração de iniciadores, sendo utilizado o Kit *Access Quick RT-PCR System* (Promega), reação total de 25 µL: 12,5 µL *Access Quick Master Mix 2x*, 6 µL água livre de nuclease e 0,5 µL da enzima *AMV reverse transcriptase* (2,5 U), etapa realizada em fluxo laminar (Pachane). O RNA (4µL) foi adicionado em microtubo de PCR junto com o iniciador, 1 µL de cada, na concentração 10 pM/µL, e, posteriormente foi realizada uma etapa de



desnaturação inicial 70°C por 10 minutos e 5 minutos a 4°C. Após essa etapa, 19 µL do *mix* de reagente, previamente preparado, foram adicionados ao RNA desnaturado, utilizando *workstation* (Loccus Biotecnologia). O ciclo da RT-PCR consistiu de um ciclo de 45°C por 45 minutos, 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos 94°C, 60°C e 72°C por 45 segundos cada etapa e extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, ao volume total de 25 µL foram adicionados 2 µL do corante *6X Blue/Orange Loading Dye* (Promega) e realizada a eletroforese (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2), acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen), visualizado e fotografado em transiluminador UV (UVP). Todos os experimentos realizados com RT-PCR e qRT-PCR *one-step* e *two-step* foram conduzidos utilizando fluxo laminar para preparação do *mix* de reagentes (Pachane) e a capela DNA workstation (Loccus Biotecnologia) para a introdução do RNA teste aos tubos contendo o *mix* de reagentes.

Foi realizado um experimento em paralelo para comparar a sensibilidade analítica da RT-PCR *one-step* com a RT-PCR *two-step*. Nos ensaios de RT-PCR e qRT-PCR *two-step* é necessário realizar um passo adicional de transcrição reversa do RNA extraído, utilizando kit *ImpromII* (Promega), seguida de PCR utilizando a enzima *Go taq* (Promega), ou para qRT-PCR, o *PowerSYBR® GreenMaster Mix* (Applied Biosystems). Resumidamente, foram adicionados 4 µL do RNA extraído, em 1 µL de cada iniciador (10 pMol), aquecimento a 70°C por 10 minutos, seguido de incubação no gelo por 5 minutos. A reação de transcriptase reversa foi realizada utilizando 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL tampão RT 10X, 2 µL dNTP 200 mM (Promega), 0,5 µL *RNasin* (Promega), 1 µL da enzima RT e 4,5 µL de água livre de nuclease. O ciclo 25°C por 15 minutos, 42°C por 1 hora e 72°C por 15 minutos. Seguida da etapa de produção do cDNA, para otimização da RT-PCR foi utilizando o volume final da reação de 20 µL: 4 µL do *buffer* 5X da enzima (concentração final 1,5 MgCl<sub>2</sub> contido no tampão), 1 µL de cada iniciador (10 pMol/µL), 0,4 µL de dNTP 200mM (Promega), 9,1 µL água livre de nuclease, 0,5 U de enzima *taq* DNA polimerase e 4 µL do cDNA previamente preparado. O ciclo utilizado foi desnaturação inicial: 95°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos: 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com extensão de 72°C por 7 minutos.

Foi realizada a eletroforese (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2) acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen), visualizado e fotografado em transiluminador UV (UVP).

#### 2.4 Clonagem plasmidial

Posteriormente à amplificação da amostra viral BTV-4 por RT-PCR, foi realizada eletroforese (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1,2% (Invitrogen) corado com brometo de etídio (Invitrogen) e visualizado em transiluminador UV (UVP). Após a corrida em gel de agarose o DNA foi purificado através do método *freeze-squeeze* (Tautz & Renz, 1983). O DNA foi recortado do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina de bisturi e o transiluminador UV (UVP), posteriormente cortado em pequenos pedaços com a lâmina de bisturi e congelado a -80°C por 30 minutos, e rapidamente centrifugado a 17.000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 5 minutos. Utilizando uma pipeta o sobrenadante foi retirado e estocado a -20°C até o uso em clonagem em vetor plasmidial *pGEM-T easy* (Promega).

A ligação do inserto ao plasmídeo foi realizada utilizando 5 µL do DNA purificado do passo anterior, 7,5 µL do tampão *2x Rapid Ligation*, 1 µL do vetor *pGEM-T easy* e 1,5 µL do *T4 DNA ligase*. Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente e a incubação overnight a 4°C, seguiu-se com a transformação bacteriana.

## 2.5 Transformação bacteriana

A transformação em bactéria *Escherichia coli gold XL10* (Invitrogen) quimicamente competente foi realizada adicionando-se ao produto da ligação do passo anterior, 100 µL de *E. coli XL10* competente. Após a incubação por 20 minutos no gelo e posterior choque térmico a 42°C por 50 segundos, seguiu-se com uma nova incubação no gelo por 2 minutos. A bactéria transformada foi transferida para um tubo de 15 mL (TPP) contendo 900 µL de meio Luria Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5% p/v, Triptona 0,1% p/v, NaCl 0,5% p/v, H<sub>2</sub>O q.s.p.), incubada por 90 minutos a 37°C, na velocidade de 150 rpm no agitador orbital (Thermo Scientific) e, posteriormente, plaqueada 100 µL da cultura bacteriana foram semeadas em placa de petri com meio LB ágar (Ágar 1,5% p/v), contendo *X-gal* (25 µg/mL-Invitrogen) e ampicilina na concentração final de 100 µg/mL (Sigma). A incubação a 37°C foi realizada por 24 horas e foram selecionadas as colônias de coloração branca.

## 2.6 Extração plasmidial em pequena escala

As colônias selecionadas foram crescidas em 10mL de meio LB com ampicilina na concentração final de 100 mg/mL (Sigma) por 16 horas. Posteriormente, foram separados 4mL da cultura bacteriana em tubo de 15mL (TPP) para a extração do plasmídeo recombinante. Após centrifugação a 1000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 10 minutos a 25°C, o sedimento foi ressuspendido em 200 µL da solução GET/RNase (9 g de glicose; 2,5 mL TRIS-HCl 1M; 5 mL EDTA 0,2 M; RNase 10 mg/mL (Invitrogen) e adicionou-se 400 µL de solução de lise (5mL de dodecil sulfato de sódio-SDS 20%; 2 mL de NaOH 10M) e 400 µL de solução neutralizante (13 g de acetato de sódio, para 100 mL de solução, (pH 4,8 ajustado com ácido acético glacial). Após homogeneização suave, o conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, incubado no gelo por 30 minutos e em seguida centrifugado a 10.000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 15 minutos a 8°C. O conteúdo foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 600 µL de álcool isopropílico, seguido de homogeneização e centrifugação 10000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por inversão e adicionou-se 500 µL de álcool etílico 70% (Merck), seguido de homogeneização e centrifugação a 10000 x g por 5 minutos; o sobrenadante foi retirado novamente por inversão e o sedimento eluído em 20 µL de água livre de nuclease. A concentração do plasmídeo recombinante foi dosada em aparelho *NanoDrop* (NanoDrop Technologies) e armazenou-se a -20°C até o momento do uso.

## 2.7 Contaminação experimental de amostras de sêmen

Uma amostra de sêmen bovino negativo, anteriormente testada através da RT-PCR para BTV desenvolvida neste trabalho, foi utilizada para realizar as análises de sensibilidade analítica, para fonte de comparação entre a sensibilidade dos vírus em cultura de célula, com as amostras de sêmen contaminado experimentalmente. O sêmen foi descongelado e em seguida contaminado com o BTV. Foram utilizados 50 µL do estoque de vírus e adicionados 450 µL de sêmen, na diluição 1:10 do estoque inicial (concentração final no sêmen  $6,3 \cdot 10^1$  TCID<sub>50</sub>/50µL).

As amostras foram mantidas sob agitação de 160 rpm no agitador orbital (Thermo Scientific), por 90 minutos a 37°C e armazenadas a 4°C para o uso subsequente.

## 2.8 qRT-PCR

A qRT-PCR foi desenvolvida utilizando *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems), em um volume total de 25µL. Brevemente, para uma reação foi utilizado 12,5 µL do tampão *Power SYBR® Green RT-PCR Mix 2X*, 0,2 µL *RT Enzyme Mix 125X*, 0,5 µL de cada iniciador (10 pMol/µL), 7,3 µL de água livre de nuclease e finalmente, 4 µL do RNA molde. A qRT-PCR foi realizada no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System™*. O ciclo da qRT-PCR *one-step* consiste em 48°C para a realização da transcriptase reversa, 95°C para desnaturação da enzima e 40 ciclos: desnaturação 95°C por 15 segundos e anelamento 60°C por 1 minuto, nesta fase que ocorreu a detecção da fluorescência. Em cada amplificação foi avaliado o *threshold cycle (Ct)* e o número de ciclos da RT-PCR em que foi detectada fluorescência. As amostras consideradas positivas apresentavam o valor de *Ct* inferior ou igual a 35, acima deste valor foi considerada inconclusiva. Amostras negativas não tiveram valor de *Ct* detectado.

A qRT-PCR *two-step* foi realizada utilizando o *PowerSYBR® GreenMaster Mix* (Applied Biosystems), com um volume total de 25 µL. Brevemente, para cada reação foi utilizado 12,5 µL do tampão *PowerSYBR® GreenMaster Mix 2X*, 0,5 µL de cada iniciador (concentração 10 pMol/µL), 7,5 µL de água e finalmente, 4 µL do cDNA. O ciclo da qRT-PCR *two-step* consiste em 95°C para desnaturação da enzima e 40 ciclos: desnaturação 95°C por 15 segundos e anelamento 60°C por 1 minuto, nesta fase que ocorreu a detecção da fluorescência. O valor do *Ct* foi estabelecido de maneira similar a qRT-PCR anterior.

## 2.9 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica da qRT-PCR, RT-PCR *one-step* e *two-step*, foram testadas através de diluições seriadas na base 10 do plasmídeo recombinante contendo o inserto de BTV-4, e do RNA extraído do vírus BTV-4 em cultura celular e amostra de sêmen experimentalmente contaminada para estabelecer o limite de detecção. O intervalo da diluição foi 10<sup>1</sup> a 10<sup>-5</sup>.

## 2.10 Sequenciamento

O plasmídeo contendo o inserto de BTV-4 foi sequenciado utilizando *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (Applied Biosystems). Resumidamente, a PCR foi realizada utilizando 1,5 µL do tampão de sequenciamento 5x, 1 µL do *BigDye*, 5,5 µL água livre de nuclease, 1,0 µL de cada iniciador M13 senso e antiseno (analisados em microtubos separados) na concentração de 10 pMol/µL e 1 µL da amostra alvo (100 ng). A PCR foi conduzida (Termociclador techne) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação 96°C por 15 segundos, anelamento 50°C por 15 segundos e extensão 72°C por 4 minutos. Após a reação de PCR seguiu-se a precipitação da amostra, adicionando-se 40 µL de álcool isopropílico 40% (Merck) preparado no momento do uso e incubação a temperatura ambiente por 30 minutos, protegido de luz. A centrifugação foi realizada a 17000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 45 minutos, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 500 µL de álcool etílico 60% (Merck), centrifugou-se novamente a 17000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi deixado secar ao ar e eluído em 15 µL de formamida HIDI

(Applied Biosystems). Em seguida, a mistura foi agitada em aparelho tipo *vortex* por 10 segundos e armazenada a 4°C até o momento de se colocar no sequenciador 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). A sequência obtida foi analisada utilizando-se softwares teóricos (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> e <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para a resolução de ambiguidades, com posterior comparação a sequências previamente depositadas no banco mundial de dados gênicos- *GenBank*.

### 3 Resultados e discussão

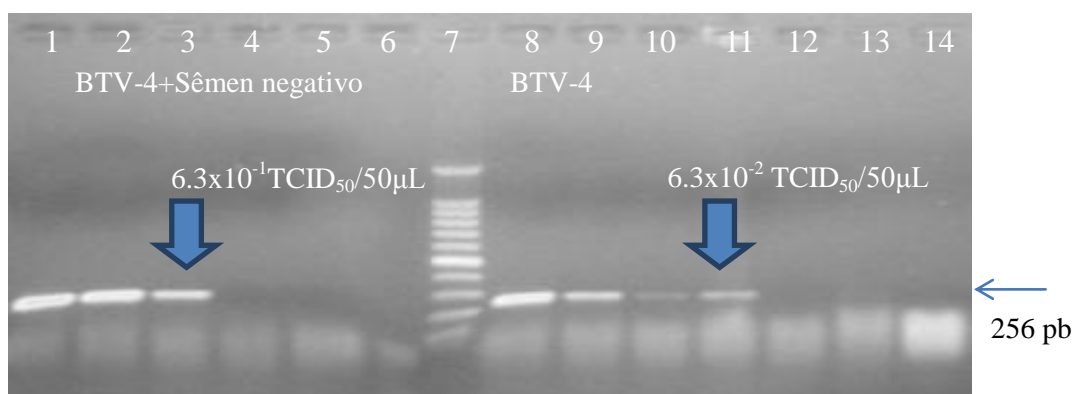
#### 3.1 Titulação viral

Após incubação por 96 horas a monocamada celular inoculada com o BTV-4 apresentou efeito citopático (ECP) viral característico, como arredondamento celular, formação de sincícios, agrupamento de células, morte e lise celular (Meenambigai *et al.*, 2006). O título de  $6,3 \cdot 10^2 \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  foi calculado segundo Reed & Muench (1938).

#### 3.2 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica da RT-PCR *one-step* e da RT-PCR *two-step* foi realizada como descrito anteriormente (secções 2.3 e 2.8). Na figura 2.1 podemos observar o resultado da RT-PCR *one-step*, onde foram realizadas diluições seriadas na base 10 do vírus BTV-4 em cultura celular e do sêmen experimentalmente contaminado. A sensibilidade na detecção foi de  $6,3 \cdot 10^{-2} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  e  $6,3 \cdot 10^{-1} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$ , respectivamente.

Utilizando a RT-PCR *one-step* foi observado um *log* de diferença no limite de detecção entre o BTV-4 em cultivo celular e sêmen experimentalmente contaminado. Essa diferença é provavelmente devido a inibidores presentes no sêmen, tendo sido ainda observada nos testes desenvolvidos para o BVDV, conforme descrito no capítulo anterior.

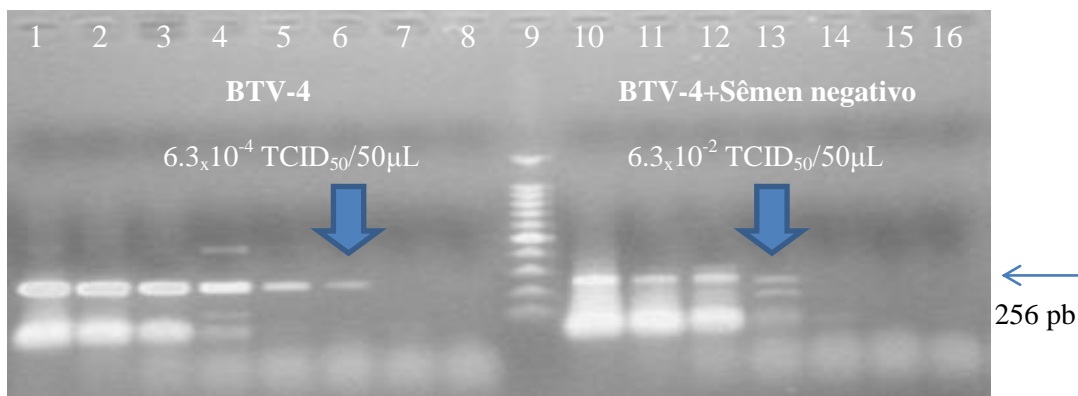


**Figura 2.1:** Sensibilidade analítica da RT-PCR *one-step* para BTV (região codificadora da NS3) para vírus em cultivo celular e amostras de sêmen contaminado experimentalmente utilizando o *Kit Access Quick* (Promega). Extração do RNA com Tri-reagente (Sigma-Aldrich). Diluição seriada na base 10 do sêmen 936, comprovadamente negativo para BTV, contaminado experimentalmente com o vírus BTV-4 canaletas 1-5; Canaleta 6 controle negativo da reação da RT-PCR; Canaleta 7 padrão de tamanho

molecular 100 pb (Promega); Canaletas 8-13 diluição seriada na base 10 do vírus BTV-4 em cultura celular; Canaleta 14 controle negativo. A sensibilidade analítica da RT-PCR para BTV-4 em cultura celular foi de  $6,3 \cdot 10^{-2} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  e  $6,3 \cdot 10^{-1} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  para sêmen experimentalmente contaminado com BTV-4.

A etapa da extração é de extrema importância, pois o sêmen possui inibidores de PCR (Wiedmann *et al.*, 1993; St-Laurent *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2007;) que podem afetar o resultado da sensibilidade analítica e da sua acurácia. Trabalho realizado por Vanbinst e colaboradores (2010) comparou a sensibilidade analítica de amostras de RNA extraídas de sêmen bovino com o uso do Kit *NucleoSpin®RNA virus* (Macherey-Nagel, Alemanha) e o método de extração utilizando o TRIzol (Invitrogen), produto similar ao utilizado nesse trabalho, tendo o TRIzol apresentado o melhor resultado. Os autores pontuaram que durante a extração por este método, inibidores de PCR são mais eficientemente retirados das amostras.

Na figura 2.2 observa-se o resultado da RT-PCR *two-step*, utilizando como molde o cDNA preparado utilizando o kit *Improm II* (Promega) a partir de RNA extraído de amostra viral em cultivo celular ou de amostra seminal experimentalmente contaminada, seguido de PCR utilizando a enzima *Go taq* (Promega). A sensibilidade foi de  $6,3 \cdot 10^{-4} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  para BTV-4 em cultivo celular e  $6,3 \cdot 10^{-2} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  para sêmen contaminado experimentalmente com BTV-4. Trabalho realizado por Akita (1993) utilizando como método de extração o fenol, a RT-PCR *two-step* e sendo a região trabalhada o seg-10, obteve como resultado de limite de detecção na PCR em amostras de sêmen de  $2,3 \text{TCID}_{50}$ . Wilson (1999) detectou  $1 \text{TCID}_{50}$  utilizando também RT-PCR *two-step*, ambos em amostras de sêmen de carneiro. O teste desenvolvido no presente trabalho mostrou uma maior sensibilidade que os dos autores citados.

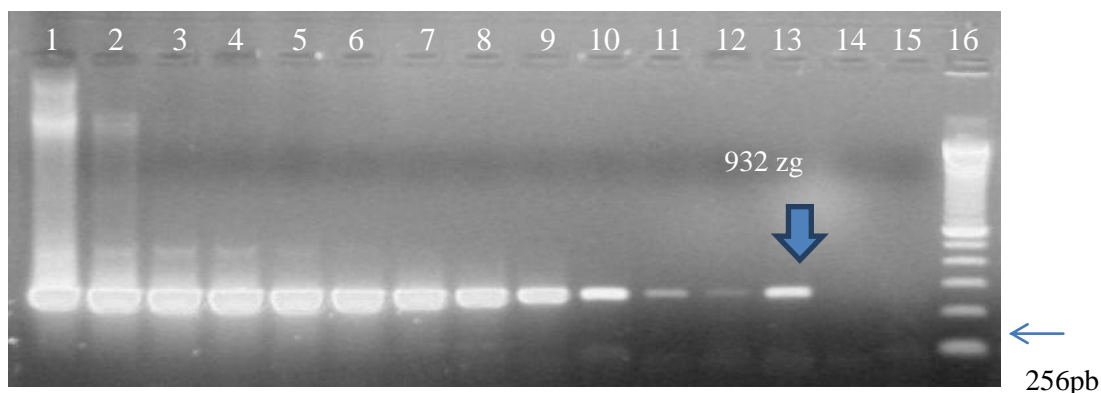


**Figura 2.2:** Sensibilidade analítica da RT-PCR *two-step* para BTV (região codificadora da NS3) para vírus em cultivo celular e amostras de sêmen contaminadas experimentalmente utilizando kit *Improm II* (Promega), seguido de PCR utilizando *go taq* (Promega). Extração do RNA foi através do Tri-reagente (Sigma-Aldrich). Diluição seriada na base 10 do vírus BTV-4 em cultura celular, canaletas 1-7; canaleta 8 controle negativo da reação; canaleta 9 padrão de tamanho molecular 100pb (Promega). Canaletas 10-15 diluições seriadas na base 10 do sêmen 936 comprovadamente negativo para BTV contaminado experimentalmente com o vírus BTV-4; Canaleta 16 controle negativo da reação. A sensibilidade analítica da RT-PCR para BTV-4 em cultura celular foi de  $6,3 \cdot 10^{-4} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  e  $6,3 \cdot 10^{-2} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  para sêmen experimentalmente contaminado com BTV-4.

A sensibilidade analítica foi maior utilizando o ensaio em *two-step*, primeiramente transcrevendo o cDNA em relação a RT-PCR *one-step* para o vírus BTV-4 em cultura celular.

Podemos observar que a partir do cDNA a sensibilidade analítica foi maior, porém a desvantagem é uma etapa adicional na metodologia aumentando o tempo laboratorial para o diagnóstico, além de aumentar a chance de contaminação laboratorial. A sensibilidade da RT-PCR *one-step* foi considerada o melhor método para o diagnóstico satisfatório de amostras de sêmen de touros naturalmente infectados e todas as análises de amostras de sêmen foram analisadas a partir desse método. Outro ponto a ser destacado foi a qualidade do produto amplificado, onde pode ser observado no teste a partir de cDNA, bandas extras adicionais dificultando o diagnóstico, da mesma forma que o observado para o diagnóstico do vírus BVDV, nos dados mostrados no capítulo anterior. Estes dados provenientes dos testes com dois distintos vírus e, a rapidez e menor chance de contaminação reforçam a indicação do uso da RT-PCR *one-step*.

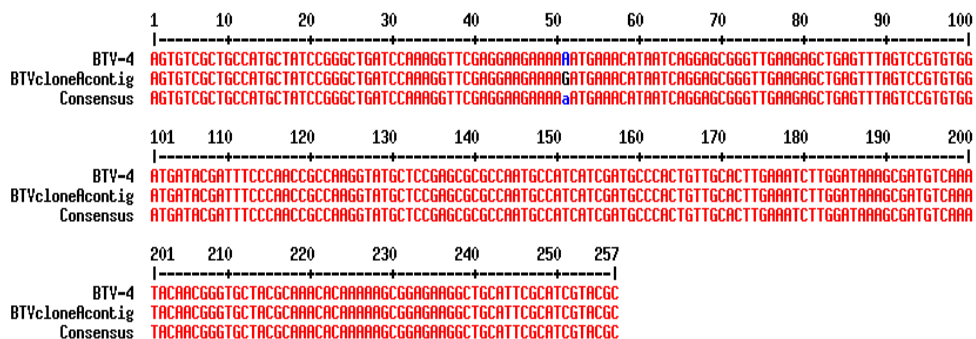
Na figura 2.3 é apresentada a amplificação a partir da diluição seriada na base 10 do plasmídeo recombinante BTV-4 utilizando a PCR para determinar a sensibilidade analítica. O limite de detecção foi de 932 zp ( $10^{-21}$ ), diluição inicial 9,21 ng ( $10^{-9}$ ) até 93,2 zg ( $10^{-21}$ ).



**Figura 2.3: Sensibilidade analítica da PCR para BTV (região NS3).** Diluição seriada do plasmídeo recombinante linearizado contendo o inserto BTV-4. Canaletas 1-14 diluição seriada na base 10, canaleta 15 controle negativo e 16 padrão de tamanho molecular 100pb (Promega). A sensibilidade detectada foi de 932 zg ( $10^{-21}$ ), diluição inicial 9,21 ng ( $10^{-9}$ ) até 93,2 zg ( $10^{-21}$ ).

### 3.3 Sequenciamento

A especificidade do produto amplificado pela PCR foi também avaliada após sequenciamento do amplicon da região NS3 do BTV-4 clonado no plasmídeo *pGEM-T easy* (Promega), utilizando iniciadores universais M13, seguido de alinhamento da sequência obtida com outras amostras previamente depositadas no *GenBank* (Figura 2.4). Podemos observar uma troca de base na posição 51.



**Figura 2.4: Especificidade do amplicon BTV verificada por sequenciamento.** Análise do sequenciamento do plasmídeo recombinantes para a região NS3 do BTV-4 - clonagem em vetor plasmidial *pGEM-T easy* (Promega). O alinhamento foi realizado com amostra previamente depositada no *GenBank* (Acesso:AY426602).

### 3.4 qRT-PCR

Os experimentos de qRT-PCR foram realizados utilizando iniciadores da região NS3 e a extração de RNA com o Tri-reagente (Sigma-Aldrich). A quantidade de iniciador padronizada foi de 5pMol por reação. O limite de detecção da fluorescência na qRT-PCR *one-step* foi de  $6,3 \cdot 10^{-1} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  tanto para o BTV-4 em cultivo de células, quanto para BTV-4 em amostra de sêmen experimentalmente contaminado utilizando o *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems). A especificidade do teste foi confirmada através da presença de um único pico na curva de dissociação.

A sensibilidade analítica foi de  $6,3 \cdot 10^{-4} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$  para BTV-4 em cultivo celular e para sêmen experimentalmente contaminado, com o cDNA previamente produzido com o kit *Improm II* (Promega) e a qPCR utilizando *PowerSYBR® GreenMaster Mix* (Applied Biosystems). A RT-PCR *two-step* utilizando cDNA como molde foi mais sensível comparando ao qRT-PCR *one-step*. Na Tabela 2.2 pode-se observar a média do valor do *Ct*. na qRT-PCR realizada em triplicata em relação a diluição.

**Tabela 2.2 Relação do valor de *Ct*. na qRT-PCR com a diluição da amostra para BTV-4**

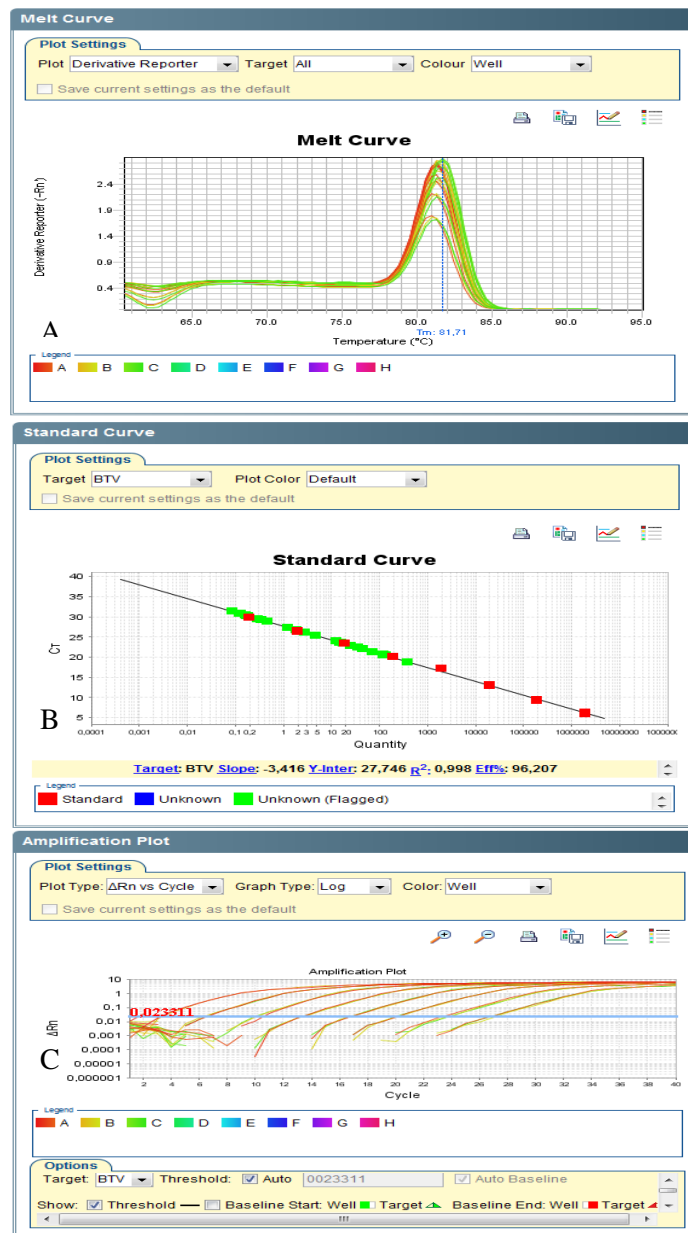
Diluição em escala logarítmica seriada base 10	<i>Ct</i> . qRT-PCR <i>one-step</i> BTV cultivo celular	<i>Ct</i> . qRT-PCR <i>one-step</i> BTV sêmen contaminado exp.	<i>Ct</i> . qRT-PCR <i>two-step</i> BTV cultivo celular	<i>Ct</i> . qRT-PCR <i>two-step</i> BTV sêmen contaminado exp.
$6,3 \cdot 10^1 \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$	28.32	29.24	18.58	19.89
$6,3 \cdot 10^0 \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$	31.28	32.87	21.25	22.54
$6,3 \cdot 10^{-1} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$	<b>34.34</b>	<b>35.52</b>	24.69	25.53
$6,3 \cdot 10^{-2} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$	37.92	39.31	27.91	28.62
$6,3 \cdot 10^{-3} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$	Sem <i>Ct</i> .	Sem <i>Ct</i> .	31.46	32.10
$6,3 \cdot 10^{-4} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$			<b>34.66</b>	<b>34.86</b>
$6,3 \cdot 10^{-5} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$			38.09	38.35

**Negrito-** Valor de *Ct*. da amostra considerado positivo

Para as amostras de sêmen o teste mais sensível foi a qRT-PCR *two-step*, porém apresentou alteração na curva de dissociação (dímero de *primer*), tornando o resultado não confiável, como discutido anteriormente no capítulo para BVDV. Para esta amostra biológica a sensibilidade do teste *one-step* foi a mesma na RT-PCR e na qRT-PCR ( $6,3 \cdot 10^{-1} \text{TCID}_{50}/50\mu\text{L}$ ). Trabalho realizado por pesquisadores belgas mostrou sensibilidade analítica de  $0,36 \text{TCID}_{50}$  (Vanbinst *et al.*, 2010) em amostras de sêmen utilizando NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Virus kit (Macherey-Nagel). A região trabalhada foi a Seg-5 e utilizou a qRT-PCR *real one-step UltraSense™ One-Step qRT-PCR kit* (Invitrogen).

Na figura 2.5 está representada a construção da curva padrão com o plasmídeo recombinante BTV-4 diluído na base 10 em triplicata, onde foram utilizadas 12 diluições. Na Figura 5A está representada a curva de dissociação mostrando a especificidade do teste onde todas as diluições consideradas positivas estão presentes dentro de um pico único. Em 5B tem-se a curva padrão gerada com o uso do plasmídeo linearizado com *slope* -3,416,  $R^2$  0,998 e eficiência de 96,207% e em 5C é mostrada a amplificação da curva padrão, onde o limite de detecção foi  $6,8 \text{ ag } (10^{-18})$ .





**Figura 2.5:** Análise da qRT-PCR para BTV *one-step* (NS3). A qRT-PCR *one-step* foi realizada no equipamento Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System™. Foi utilizado o plasmídeo recombinante BTV-4 linearizado e diluído na base 10; as amostras foram analisadas em triplicata e foram consideradas positivas as diluições que apresentavam  $C_t$  inferior ou igual a 35. Figura 5A: Curva de dissociação mostrando a especificidade da reação, onde todas as diluições estavam presentes dentro da curva e a temperatura de dissociação foi de 81,71°C; figura 5B: Curva padrão gerada com  $slope$  -3,416,  $R^2$  0,998 e eficiência de 96,207%. Figura 5C: Curva de amplificação da curva padrão.

### 3.5 Repetibilidade e Reprodutibilidade

O cálculo da repetibilidade e da reprodutibilidade teste de qRT-PCR foi realizada utilizando 10 amostras de sêmen bovino, sendo duas amostras negativas e oito positivas para o BTV. Foram realizadas três distintas extrações de cada amostra de sêmen e feitas em triplicata em tubos separados, somando um total de 90 reações, sendo realizada por pessoas diferentes em dias diferentes, para determinar a variabilidade dos ensaios intra e entre os ensaios (Tabela 2.3).

O coeficiente de variação (CV) foi determinado pelo valor do *Ct*. da qRT-PCR *one-step* de cada amostra. O CV das análises intra-ensaios variaram de 0,21 a 3,4%, e o CV inter-ensaios foi de 0,29 a 1,8% entre as amostras. Pode-se observar que a variação foi pequena entre os experimentos. Para experimentação animal com comparação de técnicas utilizando o CV a variação oscila de 20-30% (Barbosa & Sampaio, 2010). Podemos observar que a variação do CV é pequena entre os testes e dentro dos testes, sendo assim a qRT-PCR desenvolvida é considerada sensível e com alta repetibilidade.

Os testes realizados nesse trabalho foram considerados satisfatórios, com alta sensibilidade, repetibilidade e especificidade, podendo ser extrapolado para amostras de sêmen e outros fluídos biológicos como sangue e amostras de tecido. Devemos ressaltar a importância do teste de amostras de sêmen, uma vez que o BTV é uma doença de notificação obrigatória pela OIE e que pode ocorrer interrupção no comércio, não só do sêmen mais também de embrião.

Tabela 2.3 O coeficiente de variação (CV) de cada amostra para análises intra e inter-ensaios.

Número Animal	1°Triplicata	2°Triplicata	3°Triplicata	CV inter-ensaio
<b>92</b>	27.01022339	28.0708847	27.00914574	<b>0.005306769</b>
	27.32808495	26.82233047	26.67992783	
	28.62331963	28.08533859	27.77762985	
	<b>0.030898864</b>	<b>0.02621382</b>	<b>0.020743774</b>	
<b>23</b>	28.92200851	27.78339386	28.31298256	<b>0.018029295</b>
	27.18351746	27.73882866	28.99678612	
	28.71395111	27.66402054	27.17033005	
	<b>0.033578633</b>	<b>0.002175424</b>	<b>0.032769286</b>	
<b>945</b>	25.18422699	25.24365997	25.07881546	<b>0.006210287</b>
	25.60404396	24.75628281	25.99376106	
	25.57495308	25.64296722	26.04700661	
	<b>0.009210008</b>	<b>0.017611852</b>	<b>0.021172298</b>	
<b>4</b>	28.57089996	28.71705627	28.87559509	<b>0.011785886</b>
	29.77289009	28.36471176	27.15144539	
	28.33416939	28.96499634	27.31780815	
	<b>0.026700291</b>	<b>0.010517015</b>	<b>0.034233361</b>	
<b>444</b>	28.18476868	29.08394241	28.65051651	<b>0.01112377</b>
	28.08521652	28.71607399	27.0610981	
	27.63945389	29.41981888	27.27491951	
	<b>0.010382522</b>	<b>0.012107118</b>	<b>0.031182552</b>	
<b>927</b>	29.34661484	30.94342422	30.94272232	<b>0.004365557</b>
	29.72916222	30.82899857	30.77581024	
	29.40634537	30.64296722	30.17627716	
	<b>0.006977669</b>	<b>0.004922685</b>	<b>0.013158262</b>	
<b>886</b>	26.28433609	26.2704277	27.0043869	<b>0.002910886</b>
	26.38563728	26.46627808	26.773386	
	26.75620651	26.33158302	26.7640686	
	<b>0.009382675</b>	<b>0.003801773</b>	<b>0.005070825</b>	
<b>905</b>	27.608181	28.85951996	26.89435768	<b>0.01531984</b>
	28.11160278	27.16884804	27.07686615	
	27.69596252	27.4919281	26.93532372	
	<b>0.009671423</b>	<b>0.032237747</b>	<b>0.003550826</b>	

#### 4 Referências Bibliográficas

- AKITA, G.Y.; GLENN, J.; CASTRO, A.E.; OSBURN, B.I. Detection of bluetongue virus in clinical samples by polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.5, p.154–158, 1993.
- ANDERSON, J.; HÄGGLUND, S.; BRÉARD, E.; COMTET, L.; LÖVGREN BENGTSSON, K.; PRINGLE, J.; ZIENTARA, S.; VALARCHER, J.F. Evaluation of the immunogenicity of an experimental subunit vaccine that allows differentiation between infected and vaccinated animals against bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Clin. Vaccine Immunol.*, v.20, n. 8, p. 1115-1122, 2013.
- ANTHONY, S.; JONES, H.; DARPEL, K.E.; ELLIOTT, H.; MAAN, S.; SAMUEL, A.; MELLOR, P.S.; MERTENS, P.P. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7gene) from 24 BTV serotypes. *Journal of Virological Methods*, v.141, p.188–197, 2007.
- ARADAIB, I.E.; MOHAMED, M.E.H.; ABDALLA, T.M.; SARR, J.; ABDALLA, M.A.; YOUSOF, M.A.M.; HASSAN, Y.A.; KARRAR, A.R.E. Serogrouping of United States and some African serotypes of bluetongue virus using RT-PCR. *Veterinary Microbiology*, v.111, p.145-150, 2005.
- BACKX, A.; HEUTINK, R.; VAN ROOIJ, E.; VAN RIJN, P. Transplacental and oral transmission of wild-type bluetongue virus serotype 8 in cattle after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, v.138, p.235–243, 2009.
- BARBOSA, I & SAMPAIO, M. Estatística Aplicada a Experimentação Animal. 3ª Edição, 2010.
- BARRATT-BOYES, S.M.; ROSSITTO, P.V.; STOTT, J.L.; MACLACHLAN, N.J. Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine blood mononuclear cells. *Journal of General Virology*, v.73, n.8, p.1953-60, 1992.
- BARRATT-BOYES, S.M.; MACLACHLAN, N.J. Dynamics of viral spread in bluetongue virus infected calves. *Veterinary Microbiology*, v.40, p.361–371, 1994.
- BELBIS, G.; BRÉARD, E.; CORDONNIER, N.; MOULIN, V.; DESPRAT, A.; SAILLEAU, C.; VIAROUGE, C.; DOCEUL, V.; ZIENTARA, S.; MILLEMANN, Y. Evidence of transplacental transmission of bluetongue virus serotype 8 in goats. *Vet Microbiol.*, v.166, n.3-4, p. 394-404, 2013.
- BELHOUCHE, M.; MOHD JAAFAR, F.; FIRTH, A.E.; GRIMES, J.M.; MERTENS, P.P.C.; ATTOUI, H. Detection of a Fourth Orbivirus Non-Structural Protein. *PLoS ONE*, v.6, n.10, p.1-16, 2011.
- BHANUPRAKASH, V.; INDRANI, B.K.; HOSAMANI, M.; BALAMURUGAN, V.; SINGH, R.K. Bluetongue vaccines: the past, present and future. *Expert Reviews Vaccines*, v.8, p.191–204, 2009.

BONNEAU, K.R.; DEMAULA, C.D.; MULLENS, B.A.; MACLACHLAN, N.J. Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Veterinary Microbiology*, v.88, p.115–125, 2002.

BORKENT, A. (2005): The biting midges, the Ceratopogonidae (Diptera). In: Marquardt WH (ed.): *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, Burlington, Massachusetts. 113–126.

BOUWKNEGT, C.; VAN RIJN, P.A.; SCHIPPER, J.M.; HOLZEL, D.; BOONSTRA, J.; NIJHOF, A.M.; VAN ROOIJ, M.A.; JONGEJAN, F. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology*, v.52, p.183–92, 2010.

BOWEN, R.A.; HOWARD, T.H. Transmission of bluetongue virus by intrauterine inoculation or insemination of virus-containing bovine semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.45, p.1386–1388, 1984.

CASTRO, R.S. ; LEITE, R.C. ; ABREU, J.J. ; LAGE, A.P. ; FERRAZ, I.B. ; LOBATO, Z.I.P. ; BALSAMÃO, S.L.E. Prevalence of antibodies to selected viruses in bovine embryo donors and recipients from Brazil, and its implication in international embryo trade. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, v.24, p.173-176, 1992.

CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; SCHERRER, N.; HILBE, M.; EHRENSPERGER, F.; BATTEN, C.; CORTYEN, M.; HOFMANN, M.; THUER, B. Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus: Initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Veterinary Microbiology*, v.138, p.11–19, 2009.

COSTA, J.R.R.; LOBATO, Z.I.P.; HERRMANN, G.P. ; LEITE, R.C. ; HADDAD, J.P.A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do Sudoeste e Sudeste do Rio Grande do Sul. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, n.2, p.273-275, 2006.

DARPEL, K.E.; BATTEN, C.A.; VERONESI, E.; WILLIAMSON, S.; ANDERSON, P.; DENNISON, M.; CLIFFORD, S.; SMITH, C.; PHILIPS, L.; BIDEWELL, C.; BACHANEK-BANKOWSKA, K.; SANDERS, A.; BIN-TARIF, A.; WILSON, A.J.; GUBBINS, S.; MERTENS, P.P.C.; OURA, C.A.; MELLOR, P.S. Transplacental transmission of bluetongue virus 8 in cattle, UK. *Emerging Infectious Diseases*, v.15, p.2025–2028, 2009.

DE CLERCQ, K.; DE LEEUW, I.; VERHEYDEN, B.; VANDEMEULEBROUCKE, E.; VANBINST, T.; HERR, C.; MEROE, E.; BERTELS, G.; STEURBAUT, N.; MIRY, C.; DE BLEECKER, K.; MAQUET, G.; BUGHIN, J.; SAULMONT, M.; LEBRUN, M.; SUSTRONCK, B.; DE DEKEN, R.; HOOYBERGHS, J.; HOUDART, P.; RAEMAEEKERS, M.; MINTIENS, K.; KERHOFS, P.; GORIS, N.; VANDENBUSSCHE, F. Transplacental infection and apparently immunotolerance induced by a wild-type bluetongue virus serotype 8 natural infection. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.55, p.352–359, 2008.

DESMECHT, D.; VANDEN BERGH, R.; SARTELET, A.; LECLERC, M.; MIGNOT, C.; MISSE, F.; SUDRAUD, C.; BERTHEMIN, S.; JOLLY, S.; MOUSSET, B.; LINDEN, A.; COIGNOUL, F.; CASSART, D. Evidence for transplacental transmission of the current wild-type strain of bluetongue virus serotype 8 in cattle. *Veterinary Record*, v.163, p.50–52, 2008.

ELBERS, A.R.W.; BACKX, A.; MEROUC, E.; GERBIER, G.; STAUBACH, C.; HENDRICKX, G.; VAN DER SPEK, A.; MINTIENS, K. Field observations during the bluetongue serotype 8 epidemic in 2006 I. Detection of first outbreaks and clinical signs in sheep and cattle in Belgium, France and the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine*, v.87, p.21–30, 2008.

ELBERS, A.R.W.; VAN DER SPEK, A.N.; VAN RIJN, P.A. Epidemiologic characteristics of bluetongue virus serotype 8 laboratory-confirmed outbreaks in The Netherlands in 2007 and a comparison with the situation in 2006. *Preventive Veterinary Medicine*, v.92, p.1–8, 2009.

GIBBS, E.P.J.; LAWMAN, M.J.P.; HERNIMAN, K.A.J. Preliminary observations on transplacental infection of bluetongue virus in sheep – A possible overwintering mechanism. *Research of Veterinary Sciences*, v.27, p.118–120, 1979.

GROOCOCK, C.M.; CAMPBELL, C.H. Isolation of an exotic serotype of bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can J Comp Med.*, v.46, n.3, p.160-164, 1982.

HAMBLIN, C. Bluetongue virus antigen and antibody detection, and the application of laboratory diagnostic techniques. *Veterinaria Italiana*, v. 40, p.538–545, 2004.

HENNING, M.W., 1956. Animal Diseases in South Africa, 3rd edition. Central News Agency Ltd., South Africa.

HOFMANN, M.A.; RENZULLO, S.; MADER, M.; CHAIGNAT, V.; WORWA, G.; THUER, B. Genetic characterization of Toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus from goats, Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, v.14, p.1855–1861, 2008.

HOWARD, T.H.; BOWEN, R.A.; PICKETT, B.W. Isolation of bluetongue virus from bull semen. *Progress in Clinical and Biological Research*, v.178, p.127–134, 1985.

INUMARU, S.; GHIASI, H.; ROY, P. Expression of bluetongue virus group-specific antigen VP3 in insect cells by a baculovirus vector: its use for detection of bluetongue virus antibodies. *Journal of General Virology*, v.68, p.1627–1635, 1987.

KATZ, J.; ALSTAD, D.; GUSTAFSON, G.; EVERMANN, J. Diagnostic analysis of the prolonged bluetongue virus RNA presence found in the blood of naturally infected cattle and experimentally infected sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.6, p.139–142, 1994.

KIRKLAND, P.D.; MELVILLE, L.F.; HUNT, N.T.; WILLIAMS, C.F.; DAVIS, R.J. Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory-adapted virus. *Veterinaria Italiana*, v.40, p.497–501, 2004.

KONRAD, P.A.; RODRIGUES, R.O.; CHAGAS, A.C.P.; PAZ, G.F.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos leiteiros de Minas Gerais e associação com problemas reprodutivos. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia - Uruguaiana*, v.10, p.42-51, 2004.

LAENDER, J.O. *Língua azul em rebanhos de ovinos e caprinos em três mesorregiões de Minas Gerais: análise da evidência clínica e sorológica*. Dissertação de Mestrado. Escola de Veterinária da UFMG, 2002.

LAGE, A.P.; CASTRO, R.S.; MELO, M.I. ; AGUIAR, P.H.; BARRETO FILHO, J.B.; LEITE, R.C. Prevalence of antibodies to bluetongue, bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea mucosal disease viruses in water buffaloes in Minas Gerais state, Brazil. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, v.49, n.3, p.195-197, 1996.

LAGER, I.A. Bluetongue virus in South America: overview of viruses, vectors, surveillance and unique features. *Veterinaria Italiana*, v.40, n.3, p.89-93, 2004.

LEWERIN, S.S.; HALLGREN, G.; MIEZIEWSKA, K.; TREIBERG BERNDTSSON, L.; CHIRICO, J.; ELVANDER, M. Infection with bluetongue virus serotype 8 in Sweden in 2008. *Veterinary Record*, v.167, p.165–170, 2010.

LOBATO, Z.I.P. Língua azul: a doença nos bovinos. *Revista Brasileira de reprodução Animal*, v.23, n.4, p.515-523, 1999.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; VAN RIJN, P.A.; VAN GENNIP, R.G.P.; SANDERS, A.; WRIGHT, I.M.; BATTEN, C.; HOFFMANN, B.; ESCHBAUMER, M.; OURA, C.A.L.; POTGIETER, A.C.; NOMIKOU, C.; MERTENS, P.P.C. Full Genome Characterisation of Bluetongue Virus Serotype 6 from the Netherlands 2008 and Comparison to Other Field and Vaccine Strains. *PLoS ONE*, v.5, n.4, 2010.

MAAN, S.; MAAN, N.S.; NOMIKOU, K.; BATTEN, C.; ANTONY, F.; BELAGANAHALLI, M.N.; SAMY, A.M.; REDA, A.A.; AL-RASHID, S.A.; EL BATEL, M.; OURA, C.A.L.; MERTENS, P.P.C. Novel bluetongue virus serotype from Kuwait. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, p.886–889, 2011.

MAAN, N.S.; MAAN, S.; BELAGANAHALLI, M.N.; OSTLUND, E.N.; JOHNSON, D.J.; NOMIKOU, K.; MERTENS P.P.C. Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT–PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2. *PLoS ONE*, v.7, n.2, p.1-9, 2012.

MACLACHLAN, N.J.; JAGELS, G.; ROSSITTO, P.V.; MOORE, P.F.; HEIDNER, H.W. The pathogenesis of experimental bluetongue virus infection of calves. *Veterinary Pathology*, v.27, p.223–229, 1990.

MACLACHLAN, N.J.; NUNAMAKER, R.A.; KATZ, J.B.; SAWYER, M.M.; AKITA, G.Y.; OSBURN, B.I.; TABACHNICK, W.J. Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and in vitro feeding of *Culicoides variipennis*. *Archives of Virology*, v.136, p.1–8, 1994.

MACLACHLAN, N.J.; CONLEY, A.J.; KENNEDY, P.C. Bluetongue and equine viral arteritis viruses as models of virus-induced fetal injury and abortion. *Animal Reproduction Science*, v.60–61, p.643–651, 2000.

- MACLACHLAN, N.J. Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria Italiana* v.40, p.462–467, 2004.
- MAYO, C.E.; CROSSLEY, B.M.; HIETALA, S.K.; GARDENER, I.A.; BREITMEYER, R.E.; MACLACHLAN, N.J. Colostral transmission of bluetongue virus nucleic acid among newborn dairy calves in California. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.57, p.277–281, 2010.
- MEENAMBIGAI, T.V.; PRABHAKAR, T.G.; GOVINDARAJAN, R.; NACHIMUTHU, K.; KOTEESWARAN, A. A comparative study of the inclusion bodies in BHK 21 and Vero cells infected with bluetongue virus, *Tamilnadu J. Vet. and Animal Sci.*, v.2, n.6, p.248-250, 2006.
- MEHLHORN, H.; WALLDORF, V.; KLIMPEL, S.; SCHMAHL, G. Outbreak of bluetongue disease (BTD) in Germany and the danger for Europe. *Parasitology Research*, v.103, p.79–86 2008.
- MEISWINKEL, R.; GOMULSKI, L.M.; DELECOLLE, J-C.; GOFFREDO, M.; GASPERI, G. The taxonomy of Culicoides vector complexes – unfinished business. *Veterinaria Italiana*, v.40, p.151–159, 2004.
- MERTENS, P.P.C.; MAAN, N.S.; PRASAD, G.; SAMUEL, A.R.; SHAW, A.E, et al. Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J Gen Virol*, v.88, p.2811–2823, 2007.
- MELO, C.B.; OLIVEIRA, A.M.; AZEVEDO, E.O.; LOBATO, Z.I.P.; LEITE, R.C. Anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos do sertão da Paraíba. *Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.1, p.19-20, 2000.
- MELLOR, P.S. Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology* v.123, p.140–146, 2000.
- MENZIES, F.D.; MCCULLOUGH, S.J.; MCKEOWN, I.M.; FORSTER, J.L.; JESS, S.; BATTEN, C.; MURCHIE, A.K.; GLOSTER, J.; FALLOWS, J.G.; PELGRIM, W.; MELLOR, P.S.; OURA, C.A.L. Evidence for transplacental and contact transmission of bluetongue virus in cattle. *Veterinary Record*, v.163, p.203–209, 2008.
- NASON, E.L.; ROTHAGEL, R.; MURKHERJEE, S.K.; KAR, A.K.; FORZAN, M.; PRASAD, B.V.; ROY, P. Interactions between the inner and outer capsids of bluetongue virus. *Journal of Virology*, v.78, p.8059–8067, 2004.
- OLDFIELD, S.; ADACHI, A.; URAKAWA, T.; HIRASAWA, T.; ROY, P. Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology*, v.72, p.449–451, 1990.
- OSBURN, B.I. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.17, p.189–196, 1994.
- RATINIER, M.; CAPORALE, M.; GOLDBER, M.; FRANZONI, G.; ALLAN, K.; NUNES, S.F.; ARMEZZANI, A.; BAYOUMY, A.; RIXON, F.; SHAW, A.; PALMARINI, M. Identification and Characterization of a Novel Non-Structural Protein of Bluetongue Virus. *PLoS Pathog*, v.7, n.12, p.1-14, 2011.



REDDINGTON, J.J.; REDDINGTON, G.M.; MACLACHLAN, N.J. A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.3, p.144–147, 1991.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal Hygiene*, v.27, n.3, p.493-497, 1938.

ROY, P.; NOAD, R. (2006): Bluetongue virus assembly and morphogenesis. In: Roy P (ed.): Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg. 87–116.

SAEGERMAN, C.; BOLKAERTS, B.; BARICALLA, C.; RAES, M.; WIGGERS, L.; DE LEEUW, I.; VANDENBUSSCHE, F.; ZIMMER, J.Y.; HAUBRUGE, E.; CASSART, D.; DE CLERCQ, K.; KIRSCHVINK, N. The impact of naturally-occurring, transplacental bluetongue virus serotype-8 infection on reproductive performance in sheep. *Vet. J.*, v.187, n.1, p.72-80, 2011.

SANTMAN-BERENDS, I.M.G.A.; VAN WUIJCKHUISE, L.; VELLEMA, P.; VAN RIJN, P.A. Vertical transmission of bluetongue virus serotype 8 in Dutch dairy herds in 2007. *Veterinary Microbiology*, v.141, p.31–35, 2010.

SAVINI, G.; MACLACHLAN, N.J.; SANCHEZ-VIZCAINO, J.M.; ZIENTARA, S. Vaccines against bluetongue in Europe. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v.31, p.101–120, 2008.

SAVINI, G.; HAMERS, C.; CONTE, A.; MIGLIACCIO, P.; BONFINI, B.; TEODORI, L.; DI VENTURA, M.; HUDELET, P.; SCHUMACHER, C.; CAPORALE, V. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Veterinary Microbiology*, v.133, p.1–8, 2009.

SAVINI, G.; LORUSSO, A.; PALADINI, C.; MIGLIACCIO, P.; DI GENNARO, A.; DI PROVVIDO, A.; SCACCHIA, M.; MONACO, F. Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: a retrospective analysis in Italy. *Transbound Emerg Dis.*, v.61, n.1, p. 69-74, 2014.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; MERTENS, P.P.C.; CONTRERAS, V.; HEMATI, B.; PASCALE, F.; BRERAD, E.; MELLOR, P.S.; MACLACHLAN, N.J.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Veterinary Research*, v.39, p.46, 2008.

SILVA, F. J. F. Estudos de ocorrência da língua azul em São Paulo: Comissão de estudos do Ministério da Agricultura. Portaria Ministerial (relatório), n.150, Fev, 1978.

SINGER, R.S.; MACLACHLAN, N.J.; CARPENTER, T.E. Maximal predicted duration of viremia in bluetongue virus-infected cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.13, p.43–49, 2001.

SPREULL, J. Malarial catarrhal fever (bluetongue) of sheep in South Africa. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v.18, p.321–337, 1905.

ST-LAURENT, G.; MORIN, G.; ARCHAMBAULT, D. Detection of equine arteritis virus following amplification of structural and nonstructural viral genes by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v.32, p.658–665, 1994.

STOTT, J.L.; OSBURN, B.I.; MACLACHLAN, N.J. Diagnosis of bluetongue virus infection in cattle: virus isolation or serology? *Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*, v.26, p.301–318, 1983.

STOTT, J.L.; OSBURN, B.I.; ALEXANDER, L. *Ornithodoros coriaceus* (pajaroello tick) as a vector of bluetongue virus. *American Journal of Veterinary Research*, v.46, p.1197–1199, 1985.

TAUTZ, D.; RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.*, v.132, n.1, p.14-19, 1983

THIRY, J.; KEUSER, V.; MUYLKENS, B.; MEURENS, F.; GOGEV, S.; VANDERPLASSCHEN, A.; THIRY, E. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* v.37, p.169-190, 2006.

THIRY, E.; SAEGERMAN, C.; GUYOT, H.; KIRTEN, P.; LOSSON, B.; ROLLIN, F.; BODMER, M.; CZAPLICKI, G.; TOUSSAINT, J-F.; DE CLERCQ, K.; DOCHY, J-M.; DUFEY, J.; GILLEMANN, J-L.; MESSEMAN, K. Bluetongue in northern Europe. *Veterinary Record*, v.159, p.327, 2006.

THOMAS, F.C.; RANDALL, G.C.; MYERS, D.J. Attempts to establish congenital bluetongue virus infections in calves. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.50, p.280–281, 1986.

TOMICH, R. G. P.; NOGUEIRA, M. F.; LACERDA, A. C. R.; CAMPOS, F. S.; TOMAS, W. M.; HERRERA, H. M.; LIMA-BORGES, P. A.; PELLEGRIN, A. O.; LOBATO, Z. I. P.; SILVA, R. A. M. S.; PELLEGRIN, L. A.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F. Sorologia para o vírus da língua azul em bovinos de corte, ovinos e cervos campeiros no pantanal sul-matogrossense. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.61, n.4, p.1222-1226, 2009.

TWEEDLE, N.; MELLOR, P.S. (2002): Technical review – bluetongue: The virus, hosts and vectors. Version 1.5. Report to the Department of Health, Social Services and Public Safety U.K. (DEFRA), 25 p. [http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/documents/bluetongue\\_technical.PDF](http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/documents/bluetongue_technical.PDF) (accessed July 28, 2011).

VANBINST, T.; VANDENBUSSCHE, F.; DERNELLE, E.; DE CLERCQ, K. A duplex real-time RT-PCR for the detection of bluetongue virus in bovine semen. *Journal of Virological Methods*, v.169, p.162–168, 2010.

VERWOERD, D.W.; ERASMUS, B.J. 2004. Bluetongue. In: Coetzer, J.A., Tustin, R.C. (Eds.), *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd ed. Oxford Press, CapeTown, pp. 1201–1220.

WANG, J.; O'KEEFE, J.; ORR, D.; LOTH, L.; BANKS, M.; WAKELEY, P.; WEST, D.; CARD, R.; IBATA, G.; VAN MAANEN, K.; THOREN, P.; ISAKSSON, M.; KERKHOFS, P. Validation of a real-time PCR assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in bovine semen. *J. Virol. Methods.*, v.144, p.103–108, 2007.

WIEDMANN, M.; BRANDON, R.; WAGNER, P.; DUBOVI, E.J.; BATT, C.A. Detection of bovine herpesvirus-1 in bovine semen by a nested PCR assay. *J.Virol. Methods*, v.44, p.129–140, 1993.

WHETTER, L.E.; MACLACHLAN, N.J.; GEBHARD, D.H.; HEIDNER, H.W.; MOORE, P.F. Bluetongue virus infection of bovine monocytes. *Journal of General Virology*, v.70, p.1663–1676, 1989.

WILLIAMSON, S.; WOODGER, N.; DARPEL, K. Differential diagnosis of bluetongue in cattle and sheep. *Practise*, v.30, p.242–251, 2008.

WILSON, W.C. Preliminary description of a polymerase chain reaction test for bluetongue and epizootic hemorrhagic disease viral RNA in bovine semen. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.11, p.377–379, 1999.

ZIENTARA, S.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Control of bluetongue in Europe. *Vet. Microbiol.*, v.165, n.1-2, 2013.

---

## **CAPÍTULO 3 Detecção de BVDV e BTV EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

---

### **RESUMO**

Técnicas de reprodução como inseminação artificial e fecundação *in vitro*, dentre outras, estão sendo amplamente utilizadas para o melhoramento genético no rebanho bovino em todo o mundo. Nesse sentido, aumentou-se também a preocupação sanitária com doenças transmitidas via sêmen, como a diarreia viral bovina e a língua azul. Os testes diagnósticos desenvolvidos e otimizados nesse trabalho foram utilizados para testar 53 amostras de sêmen coletados em quatro diferentes municípios no Estado de Minas Gerais (Carlos Chagas, Pedro Leopoldo, Coronel Pacheco e Ituiutaba). Amostras de sêmen *in natura* foram coletadas em bovinos assintomáticos, diluídas e testadas na RT-PCR e qRT-PCR *one-step*, para BVDV e BTV. Foram encontradas 21 (39,62%) amostras positivas para BVDV e 24 (45,28%) para BTV na RT-PCR *one-step*. O número de amostras positivas na qRT-PCR *one-step* foi maior em comparação com a positividade observada em RT-PCR *one-step*, sendo 27 (50,9%) amostras de sêmen positivas para BVDV e 32 (60,4%) para BTV. A análise de concordância estatística entre os dois testes de RT-PCR e qRT-PCR *one-step* foi realizada e considerada de substancial concordância. A ocorrência de coinfeção foi observada em 28,3% (15) do total de amostras analisadas, sendo encontrado em todas as regiões amostradas. Para o BTV, os estudos foram também realizados em um laboratório no Reino Unido (*The Pirbright Institute*, laboratório de referência da OIE em BTV – doutorado sanduíche), onde foi realizado o isolamento viral de BTV em células de inseto (KC) a partir das amostras de sêmen, qRT-PCR para diagnóstico (seg-10/NS3) e qRT-PCR para análise do sorotipo de BTV circulante no Brasil (seg-2/VP2). Utilizando-se iniciadores para a mesma região gênica trabalhada no Brasil (NS3), foram encontradas 19 amostras positivas entre 50 testadas. Para a tipagem do BTV, foram inicialmente avaliados BTV-2, 4, 6, 12, 14 e 17, sendo nove amostras positivas para BTV-4, não sendo observada nenhuma amostra positiva para os outros sorotipos testados em amostra de sêmen. Em amostras de sêmen isoladas em células KC, foi realizada a qRT-PCR (seg-2/VP2) para diferenciação entre os 26 sorotipos de BTV. A amostra HPB/PS foi positiva para quatro diferentes tipos de BTV: 4, 8, 10 e 16 e foram inconclusivos para BTV-7 e BTV-12. A amostra HVB01 foi positiva para BTV: 4 e 10, e inconclusivo para BTV-7 e BTV-8. Através dos resultados obtidos pode-se observar a alta prevalência dos vírus BVDV e BTV em amostras de sêmen, e ressaltar a importância do diagnóstico antes da disponibilização das mesmas para a inseminação. Esse trabalho foi pioneiro no Brasil na tipagem de BTV em amostras de sêmen.

**Palavras-chave:** BTV, BVDV, amostra de campo, diagnóstico, RT-PCR, qRT-PCR

## ABSTRACT

Reproductive techniques such as artificial insemination, in vitro fertilization, among others, are being widely used for genetic improvement in cattle worldwide. The concern about the diseases transmitted via semen, such as bovine viral diarrhoea virus and bluetongue, has also increased. Diagnostic tests developed and optimized in this study were used to test 53 semen samples collected in four different municipalities in the State of Minas Gerais (Carlos Chagas, Pedro Leopoldo, Coronel Pacheco and Ituiutaba). Fresh semen samples were collected from asymptomatic cattle, diluted and tested in RT-PCR and qRT-PCR one-step, for the presence of BVDV and BTV. Twenty-one samples (39,62%) were positive for BVDV and 24 (45,28%) were positive for BTV using RT-PCR one-step. More samples were positive by using one-step qRT-PCR than one-step RT-PCR, 27 (50,9%) positive samples for BVDV and 32 (60,4 %) for BTV in semen. The statistical analysis of correlation between RT-PCR and qRT-PCR one-step tests was performed and it showed substantial agreement. The occurrence of co-infection was observed in 28,3% (15) of all sampled regions. Some BTV studies were also conducted in a laboratory in the UK (The Pirbright Institute, OIE Reference Laboratory for BTV- PhD sandwich), where the BTV virus isolation was performed in insect cells (KC) from the semen samples, qRT-PCR for diagnosis (seg-10/NS3) and qRT-PCR to analyse the type of BTV circulating in Brazil (seg-2/VP2). Using primers for the same gene region worked in Brazil (NS3), 19 positive samples were found among 50 tested. For the typing of BTV, were initially evaluated BTV-2, 4, 6, 12, 14 and 17, with 9 samples positive for BTV-4, and it was not observed positives samples for others serotypes in semen samples. Virus isolation in KC cells was performed in two semen samples and serotyping was performed using qRT-PCR (seg-2) for all 26 serotypes of BTV. The HPB/PS sample was positive for four different types of BTV: 4, 8, 10 and 16 and was inconclusive for BTV-7 and BTV-12. The HVB01 sample was positive for BTV-4 and BTV-10 and inconclusive for BTV-7 and BTV-8. Through the results we can observe the high prevalence of BVDV and BTV virus in semen samples, and to emphasize the importance of diagnosis before the release of it for insemination. This study was the first in Brazil in typing BTV in semen samples.

**Keyword: BTV, BVDV, field sample, diagnosis, RT-PCR, qRT-PCR**

## **CAPÍTULO 3 Detecção de BVDV e BTV EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE BOVINOS NATURALMENTE INFECTADOS NO ESTADO DE MINAS GERAIS**

### **1. Introdução**

Não se sabe exatamente quando a inseminação artificial (IA) começou a ser usada, sendo o primeiro registro histórico datado de 1784, quando um monge Italiano coletou sêmen de um cão e aplicou em uma cadela. Porém, há alguns relatos em que árabes utilizaram a IA em equinos no ano de 1332. Mais tarde, em 1949, pesquisadores ingleses demonstraram que o sêmen podia ser congelado por longo tempo a baixas temperaturas. Até então, o sêmen era mantido a 5°C e somente utilizado dentro de um período de 96 horas. A partir dessa data, a IA começou a ser difundida e atualmente muitos países utilizam esta técnica em quase a totalidade do rebanho bovino. No Brasil, o primeiro relato data de 1940, mas, somente depois de 1970 a técnica ganhou um novo impulso com a criação de empresas especializadas (ASBIA, 2012).

Foram comercializadas no ano de 2012 mais de 12 milhões de doses de sêmen, entre nacionais e importadas. Entre as raças de corte, o Nelore ganha destaque com aproximadamente três milhões de doses de sêmen nacionais, e em segundo lugar o Angus com 1.739.377 doses de sêmen importadas e 598.720 doses nacionais. No total foram 5.096.402 doses de sêmen nacional comercializadas e 2.346.185 importadas, para raças de corte. Para as raças de leite, o total de doses comercializadas foram 4.897.734, sendo 1.479.199 doses nacionais e 3.418.535 importadas. Entre as raças, destacam-se, a Holandesa, seguida da Jersey e Gir Leiteira.

O estado de Minas Gerais obteve 7,89% na participação de vendas de doses de sêmen entre as raças de corte, e 26,51% entre as raças de leite, sendo o estado que mais participou em vendas de doses de sêmen de raças leiteiras. O Brasil exportou em 2012 um total de 226.020 doses de sêmen, entre raças de corte e leite, principalmente para o Canadá, Paraguai, Colômbia e Argentina. Entre o total de 12.340.321 doses comercializadas entre nacionais e importadas, 46,71% foram importadas de diferentes países. Destas, 2.346.185 doses de sêmen foram importadas para melhorar geneticamente raças de corte e 3.418.535 para raças de leite.

A IA têm algumas vantagens em relação a outras técnicas reprodutivas, como por exemplo, ampliar significativamente a capacidade reprodutiva de um único animal. Na monta natural, 30 vacas são cobertas por um touro durante o período de um ano, enquanto que na monta controlada, 100 vacas são cobertas no mesmo período. Considerando que um touro possui quatro anos de vida reprodutiva, durante esse período produz de 120 a 400 bezerros, nas técnicas de monta natural e controlada, respectivamente. Enquanto que com a utilização da IA, esta produção sobe para 100.000 bezerros neste mesmo período de tempo. Devido ao crescimento da comercialização de doses de sêmen tanto nacionais quanto importadas, aumenta também a preocupação com a sanidade animal, uma vez, que segundo os números acima apresentados, a chance de transmissão de agentes infecciosos, hipoteticamente presentes nas amostras de sêmen, cresce também em proporção logarítmica. Entre os agentes virais comprovadamente disseminadas via sêmen bovino, destacam-se o *Bovine viral diarrhea virus* (BVDV), *Bluetongue virus* (BTV), *Bovine herpesvirus* (BoHV), *Foot and mouth disease virus* (FMDV), *Vesicular stomatitis virus* (VSV) e com menor risco, *Bovine leukemia virus* (BLV). A detecção de agentes virais em amostras de sêmen torna-se de extrema importância, uma vez que quando um agente viral circula em um rebanho, causa perdas econômicas significativas

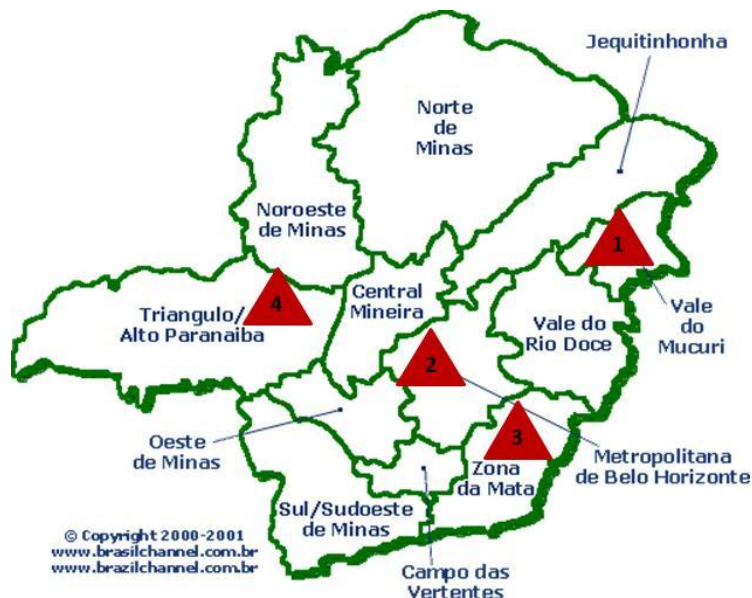
relativas a problemas reprodutivos ou a diminuição de produção, e, dificultam medidas de controle, além de causar bloqueio de comercialização de sêmen e outros produtos biológicos, como no caso do BTV.

Segundo a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA faz-se necessário cumprir os requisitos sanitários mínimos para a produção e comercialização de sêmen bovino e bubalino no Brasil. Porém, é indicado para a avaliação de agentes causadores das doenças virais somente o BVDV, contrariamente à OIE, que preconiza a detecção de mais agentes virais, dentre eles o BVDV, BTV e BoHV-1. O meio acadêmico, em consonância com sua produção científica, deve trazer subsídios aos órgãos públicos e privados, para melhorar o direcionamento e implementação de medidas de controle sanitário. Destaca-se aqui, que este projeto foi subsidiado pelo CNPq-MAPA, em uma demanda induzida, na busca de novas alternativas para os sistemas de saúde do gado bovino.

## 2. Metodologia desenvolvida no Brasil

### 2.1 Coleta de sêmen

Para avaliação dos testes desenvolvidos, foram coletadas 53 amostras de sêmen de touros de quatro fazendas de quatro regiões produtoras do estado de Minas Gerais: Carlos Chagas (34), Coronel Pacheco (4), Ituiutaba (6) e Pedro Leopoldo (9) (Figura 3.1). Os animais foram considerados sadios pelo exame clínico, e estavam em instalações adequadas para a coleta. Para a coleta do sêmen foi utilizada instalação individual para contenção, garantindo a segurança do animal e do veterinário, e auxílio de um eletroejaculador (Eletrogen-BR). Após a contagem espermática, as amostras seminais foram diluídas em PBS 1X para a concentração final de  $10^6$  células espermáticas, e após, as amostras foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.



**Figura 3.1: Mapa das Mesorregiões do Estado de Minas Gerais.** Os triângulos vermelhos indicam o local de coleta de amostras. Número 1: Carlos Chagas, 2: Pedro Leopoldo; 3: Coronel Pacheco; e 4: Ituiutaba.

## 2.2 Extração de RNA

Alíquotas de 500 µL de amostra de sêmen foram adicionadas a 1 mL de Tri-reagente (Sigma-Aldrich), para extração do RNA. Após a homogeneização, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, seguida da adição de 200 µL de clorofórmio 100% (Merck), agitação vigorosa por 15 segundos e incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 15 minutos a 4°C, sendo obtida uma mistura trifásica, uma fase aquosa transparente superior, uma interfase branco-leitosa e uma fase vermelho claro inferior (fenol-clorofórmio). Transferiu-se a fase aquosa cuidadosamente para um microtubo de 1,5 mL; posteriormente, o RNA foi precipitado adicionando 500 µl de álcool isopropílico (Merck). Incubaram-se as amostras por 10 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se uma etapa de centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Lavou-se o sedimento contendo o RNA com 1 mL de álcool etílico 75% (Merck) e centrifugou-se a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi seco ao ar brevemente, e, eluído em 20 µL de água livre de nuclease, com posterior adição de 0,93 µL de *RNasin* (Promega), seguido da incubação das amostras a 56°C por 10 minutos e armazenamento a -80°C.

## 2.3 RT-PCR

Os testes de RT-PCR utilizados para testar as amostras de sêmen foram descritos nas secções 2.3 e 2.3, capítulos BVDV e BTV, respectivamente e todas as amostras foram anteriormente testadas utilizando-se o gene normalizador GAPDH. A padronização do normalizador foi realizada utilizando o Kit *Access Quick RT-PCR System* (Promega), reação total de 25 µL: 12,5 µL *Access Quick Master Mix 2x*, 6 µL água livre de nuclease e 0,5 µL da enzima *AMV reverse transcriptase* (2,5 U), etapa realizada em fluxo laminar (Pachane). O RNA (4 µL) foi adicionado em microtubo de PCR junto com o iniciador, 1 µL de cada na concentração 10 pM/µL, e, posteriormente foi realizado uma etapa de desnaturação inicial a 70°C por 10 minutos e 5 minutos a 4°C. Após essa etapa, 19 µL do mix de reagente, previamente preparado, foi adicionado ao RNA desnaturado, utilizando-se a capela *DNA workstation* (Loccus Biotecnologia). O ciclo da RT-PCR foi de 45°C por 45 minutos (RT) e 95°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C, 60°C e 72°C por 45 segundos cada etapa e extensão final de 72°C por 7 minutos. Após a PCR, ao volume total de 25 µL foram adicionados 2 µL do corante *6X Blue/Orange Loading Dye* (Promega) e realizada a eletroforese (Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1,5% (Invitrogen), em tampão TBE 0,5X (89 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2), acrescido de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Invitrogen), visualizado e fotografado em transiluminador UV (UVP).

Para todas as amostras positivas na RT-PCR, o amplicon foi purificado utilizando-se o método *freeze-squeeze* (Tautz & Renz, 1983). Brevemente, o material genômico foi recortado do gel de agarose com o auxílio de uma lâmina de bisturi e o transiluminador UV (UVP). Posteriormente, o fragmento de gel foi cortado em pequenos pedaços com a lâmina de bisturi e congelado a -80°C por 30 minutos, e centrifugado a 17.000 x g (MicroCL 17R Thermo Scientific) por 5 minutos. Utilizando uma pipeta o sobrenadante foi retirado, dosado em aparelho *NanoDrop* (NanoDrop Technologies) e estocado a -20°C até o uso (para sequenciamento).



## 2.4 qRT-PCR

A qRT-PCR para os vírus BTV e BVDV foi realizada utilizando-se o *Power SYBR® Green RNA-to-CT™ 1-Step Kit (Applied Biosystems)*, conforme secções 2.8 e 2.8 (BVDV e BTV, respectivamente). Todas as amostras foram testadas anteriormente para o gene normalizador GAPDH, descrito nesse capítulo. A qRT-PCR foi realizada no equipamento *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System™*. Em cada amplificação foi avaliado o limiar de detecção da fluorescência (*Ct*). As amostras consideradas positivas apresentavam o valor de *Ct* igual ou inferior a 35. Acima deste corte, consideraram-se as amostras inconclusivas e as negativas não apresentaram valor de *Ct*.

## 2.5 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste *Kappa*, para comparar a concordância entre a RT-PCR e a qRT-PCR, utilizando-se a fórmula  $\frac{2(PPxNN - PNxNP)}{N1xN4 + N2xN3}$ , que estabelece o índice de concordância entre as técnicas (tabela 3.1). A concordância é classificada e denominada de acordo com Landis e Koch (1977): valores do índice *Kappa* < 0 = nenhuma concordância; valores entre 0 – 0,19 = baixa concordância; valores entre 0,20 – 0,39 = regular concordância; valores entre 0,40 – 0,59 = moderada concordância; valores entre 0,60 – 0,79 = substancial concordância; valores entre 0,80 – 1,00 = alta concordância.

**Tabela 3.1 Tabela para auxílio do cálculo do índice *Kappa* (análise estatística utilizada para concordância entre dois testes diagnósticos).**

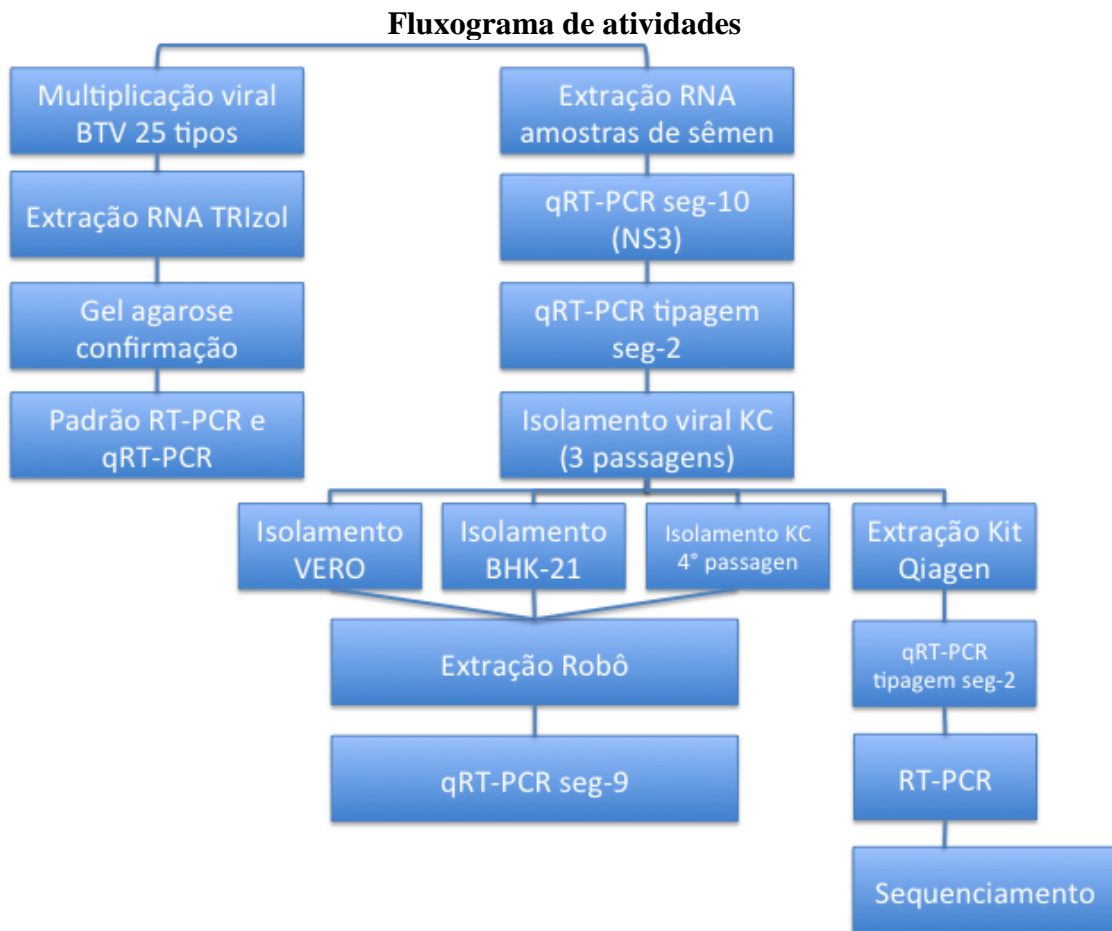
		qRT-PCR		
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	PP	PN	N1
	Negativo	NP	NN	N2
		N3	N4	Total
$Kappa = \frac{2(PPxNN - PNxNP)}{N1xN4 + N2xN3}$				

## 2.6 Sequenciamento

As amostras positivas para BVDV e BTV nos ensaios de RT-PCR desenvolvidos foram sequenciadas utilizando *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (Applied Biosystems). Resumidamente, a PCR foi realizada utilizando-se 1,5 µL do tampão de sequenciamento 5x, 1 µL do *BigDye*, 5,5 µL de água livre de nuclease, 1 µL de cada iniciador específico senso e antisenso (analisados em poços separados) na concentração de 10 pMol/µL e 1 µL da amostra alvo (10 ng/100 pb). A etapa inicial da PCR foi conduzida no termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) em placa *MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems), com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 96°C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação 96°C por 15 segundos, anelamento 50°C por 15 segundos e extensão 72°C por 4 minutos. Após a reação de PCR seguiu-se a precipitação da amostra, adicionado por poço 2,5 µL de EDTA 125 mM (pH 8) e 30 µL de álcool etílico 100% (Merck). Após a placa selada e homogeneizada, foi realizado a incubação à temperatura ambiente e no escuro por 15 minutos, centrifugação a 873 x

g por 45 minutos (Jouan BR4i-Thermo Scientific). Posteriormente, foi retirado o excesso de etanol/EDTA e adicionado 30 µL de etanol 70% (Merck), novamente centrifugado a 617 x g (JouanBR4i-Thermo Scientific) por 15 minutos. Retirado o sobrenadante, o sedimento foi secado por 5 minutos a 95°C e eluído em 15 µL de formamida HIDI (Applied Biosystems).

### 3 Metodologia desenvolvida no Instituto Pirbright (*The Pirbright Institute* - UK)



Esta parte dos experimentos foi conduzida durante a realização do doutoramento sanduíche. O laboratório localizado no *The Pirbright Institute*, Pirbright, Reino Unido, é referência no diagnóstico de BTV da União Europeia (UE) e da OIE, estando totalmente equipado para a realização do isolamento e caracterização dos sorotipos do BTV. O Dr. Peter P. C. Mertens dirige o *Pirbright Laboratory of Bluetongue and related viruses*, sendo referência mundial em BTV e consultor da Organização Mundial de Saúde Animal nesta área.

### 3.1 Extração de RNA

#### 3.1.1 Uso do TRIzol para extração de RNA de amostras virais em cultivo celular

Foi realizado primeiramente a multiplicação viral de todos os 25 tipos de *Bluetongue virus* conhecidos para serem utilizados como controle positivo da RT-PCR e qRT-PCR *one-step*. Foram utilizados 4 frascos T-175cm<sup>2</sup> Cellstar (Greiner Bio-One, Inc., Monroe, NC, EUA) de célula Baby Hamster Kidney (BHK-21, ATCC CCL-10) para cada sorotipo de BTV (BTV-1 ao 26), isolados de referência pertencentes ao *The Pirbright Institute-UK*. Após a infecção, os isolados foram incubados a 37°C até apresentar 100% de ECP, morte e lise celular. Em seguida a monocamada foi raspada com o auxílio de um rodinho (Greiner Bio-One) e transferida para tubo Falcon 50mL (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Esta etapa foi realizada em fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific) e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1600 x g por 10 minutos (Rotanta 460R, Hettich Freiburg, Baden-Württemberg, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e a extração de RNA foi realizada em seguida, utilizando-se o precipitado celular.

Para cada frasco T-175cm<sup>2</sup> Cellstar (Greiner Bio-One) foram adicionados 2 mL de TRIzol (Invitrogen), homogeneizado até o precipitado ser completamente dissolvido e incubado à temperatura ambiente por pelo menos 10 minutos para garantir que todas as partículas virais fossem inativadas e seguindo as etapas subsequentes da extração de RNA fora do fluxo laminar. A mistura foi transferida para microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), adicionadas 200 µL de clorofórmio (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemanha) e homogeneizadas utilizando aparelho do tipo *vortex* até a mistura apresentar coloração rosada. A próxima etapa consistiu de incubação em gelo por 10 minutos e centrifugação a 8500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente em centrífuga Eppendorf 5414 D (Eppendorf). A mistura foi separada em três camadas, a camada inferior vermelha com fenol-clorofórmio, uma camada intermediária e uma superior incolor contendo o RNA. Cuidadosamente, a fase incolor foi removida para um novo microtubo 1,5 mL (Eppendorf) e foram adicionados 900 µL de isopropanol (VWR chemicals), seguida de homogeneização e incubação por 2h a -20°C. Depois de transcorrido o tempo seguiu-se para centrifugação a 8500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, e o precipitado foi lavado com etanol 70% (VWR chemicals) e centrifugado nas mesmas condições do passo anterior. Posteriormente, o RNA foi deixado secar por 1 hora à temperatura ambiente, e foram adicionados 100 µL de água livre de nuclease (Qiagen, Venlo, Limburg, Holanda) e 100 µL de cloreto de lítio 4 M (Sigma-Aldrich), seguido de incubação *overnight* a 4°C. O cloreto de lítio tem a função de separar o RNA fita simples do RNA dupla fita.

Posteriormente, centrifugou-se o tubo a 8500 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante contendo RNA dupla fita de BTV foi transferido com o auxílio de uma pipeta (*Thermo Scientific*) para um novo tubo de 1,5 mL (Eppendorf). Após a adição de 200 µL de isopropanol (VWR chemicals) e 50 µL de acetato de amônio 7,5 M (Sigma-Aldrich), mais um passo de incubação foi realizado a -20°C por 2 horas. Depois disso as amostras foram centrifugadas e lavadas com etanol 70% (VWR chemicals) como no passo anterior. Após secar por uma hora à temperatura ambiente, o material proveniente originalmente de cada frasco 175cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One) foi eluído em 40 µL de água livre de nuclease (Qiagen) e armazenado a -20°C até o uso.

### 3.1.2 Uso do TRIzol LS para extração de RNA de amostras virais no sêmen

A extração do RNA foi realizada utilizando TRIzol®LS (Invitrogen). Brevemente, em 250 µL de sêmen foi adicionado 750 µL de TRIzol®LS (Invitrogen). As cinquenta amostras foram homogeneizadas por pipetagem, utilizando fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific). Após a fase de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, retirada das amostras do fluxo e adição de 200 µL de clorofórmio (Riedel-de-Haën), as amostras foram vigorosamente homogeneizadas com as mãos por 15 segundos. Em seguida foi feita incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 8500 x g em centrífuga *Eppendorf* 5414 D (*Eppendorf*) por 15 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi dividida em três distintas fases, com uma pipeta (*Thermo Scientific*), o sobrenadante foi retirado com cuidado e transferido para um microtubo de 1,5 mL e adicionados 900 µL de isopropanol (*VWR chemicals*, Radnor, PA, EUA). As amostras foram incubadas a -20°C por 2 horas e centrifugadas a 8500 x g por 10 minutos. Em seguida foi feita a etapa de lavagem do RNA com etanol 70% (*VWR chemicals*), e centrifugação 8500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o excesso de etanol foi retirado com o auxílio de uma pipeta. O RNA foi deixado secando por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente foi eluído em 25 µL de água livre de nuclease (*Qiagen*) e armazenado a -20°C até o uso.

### 3.1.3 Extração de RNA com o *QIAamp Viral RNA Mini Kit*

Foi utilizado o Kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (*Qiagen*) para extração de RNA a partir do sobrenadante de cultivo celular infectado com vírus. Resumidamente, foram adicionados 1120µL do tampão AVL em microtubo de 1,5mL (*Eppendorf*), previamente preparado como recomenda o fabricante. Os tampões de lavagem AW1 e AW2 também foram preparados previamente com adição de etanol 100% (*VWR chemicals*). O sobrenadante do cultivo celular, 280µL, foi adicionado dentro de fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (*Thermo Scientific*), homogeneizado e incubado por 10 minutos para total inativação viral, depois dessa etapa a extração do RNA foi realizada fora do fluxo laminar. Foi adicionado 1120 µL de etanol 100% (*VWR chemicals*) a um tubo do tipo *Bijou* (*Sterilin*, Newport, Reino Unido), e adicionada a mistura sobrenadante celular e tampão AVL. A mistura foi homogeneizada, e 630 µL foram adicionados à coluna, que foi centrifugada a 5680 x g por 1 minuto à temperatura ambiente em centrífuga *Eppendorf* 5414 D (*Eppendorf*). Essa etapa foi repetidas 4 vezes, até todo conteúdo do tubo *bijou* passar pela coluna. Na etapa subsequente, foi realizada a lavagem com 500 µL de tampão AW1, seguida de centrifugação a 5680 x g por 1 minuto e outra etapa de lavagem com 500 µL de tampão AW2, com centrifugação a 8500 x g por 3 minutos. Após, foram adicionados 30 µL de água livre de nuclease à coluna, incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de centrifugação 5680 x g por 1 minuto. O RNA foi armazenado a -20°C até o uso.

### 3.1.4 Extração robótica de RNA utilizando o *KingFisher*

Amostras de sobrenadante celular da primeira a quarta passagem em células KC e também as passagens em células de mamífero tiveram seu RNA extraído utilizando o kit *MagVet™ Universal Isolation Kit* (*Le Bois Dieu*, Lissieu, França). Primeiramente, os reagentes foram preparados como recomendado pelo fabricante. Foram basicamente utilizados um reagente de lise celular, esferas magnéticas, três tampões de lavagem e um tampão de eluição. Resumidamente, 250 µL do reagente de lise NM1 foi adicionado em uma placa

*MagMax™ Express Microtiter 96 Deep well Plate* (Applied Biosystems), e em outras 3 placas iguais, foram adicionados 600 µL do tampão de lavagem NM3, em outra placa 600 µL do segundo tampão de lavagem NM4 e na última placa foi adicionado 600 µL de etanol 80% (VWR chemicals). À uma outra placa *MagMax™ Express 96 plate 200 µL* (Applied Biosystems) foram adicionados 80 µL do tampão NM6 para eluir o RNA. Depois de todos os reagentes distribuídos nas placas, a placa contendo o tampão de lise NM1 foi levada para um fluxo laminar *classe II maxisafe 2020* (Thermo Scientific) onde foram adicionados 100 µL do sobrenadante do cultivo celular. O passo seguinte consistiu na adição de 620 µL das esferas magnéticas (*beads-20 µL*) que foram diluídas em 600 µL do tampão NM2 *binding*. As placas com os reagentes foram mantidas por 10 minutos dentro do fluxo laminar. Transcorrido esse período a placa foi retirada do fluxo e colocada na posição um do robô *KingFisher Flex* (Thermo Scientific) e as outras placas colocadas nas posições 2, 3, 4 e 5, respectivamente. O ciclo de extração robótica foi de 40 minutos, sendo que nos primeiros 10 minutos utilizou-se baixa agitação para a lise celular e esta foi aumentada para a ligação do RNA com as esferas magnéticas, que posteriormente foram transferidas para as etapas de lavagem. No final das três etapas de lavagem, seguiu uma etapa de secagem do RNA por 5 minutos e depois as esferas magnéticas contendo o RNA foram transferidas para a última etapa de eluição por 10 minutos. O RNA eluído foi retirado do robô, coberto com um selo *Adhesive PCR film* (Thermo Scientific) e armazenado a -20°C até o momento do uso.

### 3.2 Diagnóstico de BTV em amostras de sêmen utilizando qRT-PCR e o segmento 10 (NS3)

As amostras de sêmen extraídas no passo anterior (3.1.2) foram testadas através de qRT-PCR *One-Step* utilizando iniciadores que flanqueiam a região codificadora da proteína não estrutural NS3 que são codificadas por genes do segmento 10, segundo Orrú e colaboradores (2006). Para a reação foi utilizada a enzima *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen), volume total de 25 µL: 12,5 µL do tampão *2X Reaction mix* (0,4 mM de dNTP e 6 mM de MgSO<sub>4</sub>), 1 µL de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>-50mM), 0,5 µL de cada iniciador na concentração de 20 pMol, 1 µL de sonda a 5 pM, 0,5 µL de ROX a 2,5 µM, 0,5 µL da enzima *SuperScriptIII RT/Platinum Taq Mix*, água livre de nuclease (Qiagen) e 6 µL de RNA. Primeiramente, o RNA foi colocado na placa de 96 poços (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), coberto com selo (B.I.S., Kirkham, Lancashire, Reino Unido) e realizada uma desnaturação inicial de 99°C por 5 minutos em termociclador *TP Professional Thermocycler* (Biometra, Goettingen, Alemanha), seguida da adição de 19 µL do *mix* de reagentes, homogeneização e centrifugação em Sorvall Legend RT (Thermo Scientific) 185 x g por 1 minuto. O equipamento utilizado para a qRT-PCR foi o Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies). A qRT-PCR consiste em um ciclo de 48°C por 30 minutos para a realização da transcrição reversa, seguido de um ciclo de 95°C por 2 minutos para a desnaturação da enzima de transcriptase reversa e 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento 56°C por 30 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos. O sinal de fluorescência foi detectado na fase de extensão e as amostras foram consideradas positivas com *Ct.* até 35, e acima desse valor foram consideradas inconclusivas e sem *Ct.*, negativas.

### 3.3 Diagnóstico de BTV em amostras cultivadas em células utilizando qRT-PCR e o segmento 9 (VP6)

Foram testadas os isolados de sêmen em passagens em células KC, BHK-21 e VERO, utilizando iniciadores (Eurogentec, Liège, Bélgica) do gene do segmento nove que codifica a proteína estrutural VP6, que é o teste utilizado no laboratório de referência no *The Pirbright Institute* para diagnóstico de amostras de campo suspeitas de infecção pelo BTV. Após a extração do RNA utilizando o robô *KingFisher*, as amostras foram submetidas a qRT-PCR utilizando o Kit *SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen) para reação total de 25 µL foram utilizados: 12,5 µL do tampão 2X *Reaction mix* (0,4 mM de dNTP e 6 mM de MgSO<sub>4</sub>), 1 µL de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>-50 mM), 1 µL de cada iniciador na concentração de 20pM, 1 µL de probe a 5 pM, 0,5 µL de ROX a 2,5 µM, 0,5 µL da enzima *SuperScriptIII RT/Platinum Taq Mix*, água livre de nuclease (Qiagen) e 6 µL de RNA. Como descrito anteriormente a desnaturação inicial do RNA e adição do *mix* de reagentes é semelhante ao realizado no passo 4.2.2. O ciclo da qRT-PCR consiste em um ciclo inicial a 55°C por 30 minutos para a realização da transcriptase reversa, desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos. Seguido de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. O sinal da fluorescência foi detectado na fase de anelamento a 60°C. As amostras foram consideradas positivas com *Ct.* até 35, acima disso foram consideradas inconclusivas e, sem valor de *Ct.*, negativas.

### 3.4 qRT-PCR para tipagem de BTV

Posterior a qRT-PCR (seg-10), as amostras seguiram para qRT-PCR para determinar o tipo de BTV circulante no Brasil utilizando iniciadores para o segmento 2 do genoma, que codifica proteína estrutural do capsídeo VP2 (o principal determinante do sorotipo do vírus). Amostras de sêmen foram testadas inicialmente para BTV-4 e 12, seguido por 2, 6, 14 e 17, e, posteriormente, os isolados foram testados para os 26 sorotipos conhecidos de BTV. Os iniciadores e sondas (Eurogentec) são específicos para cada tipo do BTV. Para a reação foi utilizada a enzima *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen), volume total de 25 µL: 12,5 µL do tampão 2X *Reaction mix* (0,4 mM de dNTP e 6 mM de MgSO<sub>4</sub>), 1 µL de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>-50mM), 1 µL de cada iniciador na concentração de 10 pM, 0,5 µL de probe a 5 pM, 0,5 µL de ROX 2,5 µM, 0,5 µL da enzima *SuperScriptIII RT/Platinum Taq Mix*, água livre de nuclease (Qiagen) e 6 µL de RNA. Como descrito anteriormente, a desnaturação inicial do RNA e adição do *mix* de reagentes é semelhante ao realizado no passo 4.2.2. O ciclo da qRT-PCR consiste em um ciclo de 55°C por 30 minutos para a realização da transcriptase reversa, seguido de um ciclo de 95°C por 10 minutos para a desnaturação da enzima de transcriptase reversa e 50 ciclos desnaturação de 95°C por 30 segundos e anelamento de 60°C por 1 minuto. O sinal de fluorescência foi detectado na fase de anelamento e as amostras foram consideradas positivas com *Ct.* até 35, acima disso foram consideradas inconclusivas e, sem *Ct.*, negativas.

### 3.5 Sequenciamento

#### 3.5.1 PCR

Amostras que foram positivas para a qRT-PCR com *Ct.* abaixo de 35 foram submetidas a PCR para sequenciamento. Nessa etapa, foi utilizado o Kit *SuperScript®III One-Step RT-PCR*

*System with Platinum®Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). Foram utilizados diferentes pares de iniciadores (Eurogentec) para amplificar o seg-2 (sorotipo específico), seg-7, 8, 9 e seg-10. O volume total da reação foi de 50 µL e para cada reação: 25 µL de 2X *Reaction Mix* (0,4 mM de dNTP e 3,2 mM MgSO<sub>4</sub>), 7,5 µL de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>-5mM), 2 µL de cada iniciador na concentração de 10 pM, 1 µL da enzima SuperScript®III RT/Platinum® *Taq Mix* e 6,5 µL de água livre de nuclease (Qiagen). O volume de 6 µL do RNA foi adicionado em microtubos do tipo *snapstrip* PCR (SSI-Scientific Specialties Inc., Thurman St. Lodi, CA, EUA) e desnaturado a 99°C por 5 minutos, transferido imediatamente para o gelo e adicionado 43 µL do *mix* de reagentes. A reação de PCR foi transferida para o termociclador TP Professional Thermocycler (Biometra) e o ciclo foi iniciado pela transcriptase reversa a 55°C por 30 minutos, seguido de desnaturação da transcriptase reversa 95°C por 2 minutos. Posteriormente, foram feitos 40 ciclos de desnaturação 95°C por 30 segundos, anelamento 55°C por 30 segundos e extensão 68°C por 2 minutos, seguido de uma extensão final de 68°C por 5 minutos.

O produto da PCR foi resolvido em agarose a 1%. O produto da PCR (5 µL) e o padrão de tamanho molecular 1Kb Plus (Invitrogen), foram aplicados no gel e corrido em fonte *Power Pac Basic* (Biorad, Hercules, CA, EUA). A visualização e o registro fotográfico foram realizados no equipamento *Gel Doc™XR+with Image Lab™ Software* (Biorad).

### 3.5.2 Purificação do produto de PCR

#### 3.5.2.1 Purificação direta do produto de PCR

O produto da PCR visualizado no gel de agarose apresentou banda específica do tamanho esperado e seguiu para purificação do DNA utilizando o kit *DNA clean & Concentrator™* (Zymo Research, Irvine, CA, EUA). Aos 45 µL do restante do produto da PCR foram adicionados 250µL do tampão *DNA binding* e a mistura foi transferida para uma coluna e centrifugada por 30 segundos a 5680 x g (Eppendorf). Seguiu-se para a lavagem com 200 µL do tampão *DNA wash*, centrifugação por 30 segundos a 5680 x g (Eppendorf), e essa etapa foi repetida por mais uma vez. Foram adicionados 30 µL de água livre de nuclease (Qiagen) na coluna, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 30 segundos a 5680 x g (Eppendorf) para eluição do DNA. A quantidade e a qualidade do DNA purificado foram analisadas em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) e o mesmo foi mantido à temperatura de -20°C até o momento do uso.

#### 3.5.2.2 Gel de agarose

Foram realizadas purificações dos *amplicons* em gel de agarose 1% (Invitrogen), a partir das amostras que apresentaram o tamanho esperado. Depois de todo o produto de PCR ser corrido em gel de agarose 1%, a banda foi cortada com lamina de bisturi (Swann-Morton Limited, Owlerton Green, Sheffield, Inglaterra), com o auxílio de um transiluminador UV (Vilber Lourmat, Impasse des Coutures, Torcy, França) e transferido para microtubos de 1,5mL (Eppendorf). Utilizando o kit de purificação de amplicons *Zymoclean™Gel DNA Recovey Kit* (Zymo Research), adicionou-se 300µL do tampão ADB e incubou-se a 50°C por 10 minutos em aquecedor Driblock DB-2A (Techne, Stone, Staffordshire, Reino Unido) ou até todo o gel ser completamente fundido. Depois dessa etapa, a solução foi transferida para coluna Zymo-Spin e, a mesma foi centrifugada a 9370 x g por 1 minuto (Eppendorf), seguido de lavagem com 200 µL de tampão *DNA wash* e centrifugação por 30 segundos a 9370 x g (Eppendorf). A etapa de

lavagem foi realizada por duas vezes. Foram adicionados 15 µL de água livre de nuclease na coluna, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 9370 x g por 1 minuto. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) e mantido à temperatura de -20°C até o momento do uso.

### 3.5.3 Reação de sequenciamento

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystem) e diferentes iniciadores (Eurogentec) já utilizados para amplificação na PCR. Em cada reação foram utilizados 0,5 µL do *BigDye® Terminator v3.1 cycle Sequencing RR-100*, 1,75 µL do Tampão *BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5X Sequencing*, 1 µL de cada primer na concentração de 10 pM e diferentes concentrações de DNA dependendo do comprimento do produto (tabela 3.2) e água livre de nuclease (Qiagen) para completar um volume total de 10 µL de reação. Para a reação de PCR foi utilizada a placa *ThermoFast®96 Non-Skirted* (Thermo Scientific) e selo *Adhesive PCR film* (Thermo Scientific). O ciclo da PCR do sequenciamento consistiu de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto e 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e 60°C para extensão, por quatro minutos. Após a PCR do sequenciamento, o produto seguiu para a purificação, e foram adicionados 5 µL de EDTA (Sigma-Aldrich) a 125 mM e 60 µL de etanol 100% (VWR chemicals). A mistura foi homogeneizada e transferida para a placa de sequenciamento *96 well optical reaction plate with Barcode* (CODE 128) ABI PRISM (Applied Biosystems). A placa foi selada utilizando um adesivo de alumínio *Adhesive PCR foil seals* (Thermo Scientific) e mantida à temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Após centrifugação a 3000 x g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado por inversão da placa em papel absorvente. A placa foi centrifugada a 185 x g por 1 minuto, invertida, para a total retirada do EDTA+etanol. Uma etapa subsequente de lavagem foi realizada, utilizando-se 30 µL de etanol 70% (VWR chemicals) e centrifugação a 1650 x g por 15 minutos a 4°C. A placa foi mantida por uma hora à temperatura ambiente para a secagem do DNA, que foi posteriormente eluído em 20 µL de formamida HI-DI™ (Applied Biosystems). O material foi sequenciado no *3750 DNA Analyser* (Applied Biosystems).

**Tabela 3.2 Quantidade de DNA para sequenciamento com relação ao comprimento do produto da PCR**

Tamanho do produto da PCR	Quantidade
100-200pb	1-3ng
200-500pb	3-10ng
500-1000pb	5-20ng
1000-2000pb	10-40ng
>2000pb	40-100ng

Primeiramente as seqüências foram analisadas em SeqMan Pro (DNASTar, Madison, WI, EUA), depois, foi realizado o alinhamento com o *software* ClustalW no programa BioEdit (Hall, 1999) e análises filogenéticas e moleculares foram realizadas utilizando-se o programa MEGA versão 5 (Tamura K. et al., 2011). A construção da árvore filogenética foi realizada com o teste *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando *Bootstrap* como parâmetro do teste da filogenia com 1000 replicatas. O modelo estatístico foi o *p-distance*, utilizando transições e transversões para substituições e *Pairwise deletion* com tratamento de falhas nos resultados.



O método de *Neighbor-Joining*, ou agrupamento de vizinhos, foi desenvolvido por Saitou e Nei em 1987 e é baseado no princípio da evolução mínima. O método não examina todas as topologias possíveis, mas procura encontrar sequencialmente vizinhos que minimizem o comprimento total da árvore. No método NJ a construção da árvore começa com uma topologia em forma de estrela. Inicialmente conectam-se os dois táxons mais estreitamente relacionados (vizinhos), que passam a ser considerados um único táxon. O processo se repete até que todos os táxons estejam conectados (SCHNEIDER, 2003). O *bootstrap* é um parâmetro utilizado para medir o grau de suporte dos nós nas árvores filogenéticas pelo alinhamento das sequências, conferindo confiabilidade às árvores desenhadas. O valor do *bootstrap* representa a porcentagem de vezes em que aquele mesmo agrupamento ocorreu nas diversas replicatas. Um número alto de *bootstrap* indica um alto nível de confiança na ocorrência de determinado agrupamento. Por ser um modelo matemático, o *bootstrap* não avalia a exatidão da árvore, somente indica a consistência e estabilidade dos braços da árvore (SCHNEIDER, 2003). Trabalhos de subtipagem encontrados na literatura utilizam como padrão o teste de *bootstrap* com 1000 réplicas, e consideram um bom suporte do agrupamento valores maiores que 80%.

### 3.6 Isolamento de BTV em cultivo celular

#### 3.6.1 Células KC

Amostras de sêmen que apresentaram baixo valor de *Ct*. (menor que 35) na qRT-PCR seg-10, foram submetidas ao isolamento viral utilizando células derivadas de *Culicoides sonorensis* (KC). O meio de cultura utilizado para manter essas células foi o *Schneider's Insect Medium* (Sigma-Aldrich), suplementado com 1% de antibiótico contendo penicilina e estreptomicina 10.000U (Sigma- Aldrich), 1% de fungizona (Gibco) e 15% de soro fetal bovino (Gibco). Primeiramente o meio de cultura foi preparado em fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific), e no mesmo fluxo laminar foram preparadas as células KC para o isolamento viral. Resumidamente, o meio que estava no frasco foi retirado por inversão e adicionado 10mL (diluição 1:10) do meio de cultura suplementado. As células foram soltas do fundo do frasco com leves batidas contra a palma da mão, sem o uso de tripsina. Com o auxílio de uma pipeta descartável de 10ml foi retirado 1 mL de célula KC do frasco de origem e adicionado em um frasco pequeno T-25cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One) e adicionado, posteriormente, 6mL do meio de cultura suplementado.

Em outro fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific), as amostras foram diluídas 1:5, 1:10 e 1:20 em meio de cultura suplementado. O volume de 1 mL dessa diluição foi adicionado na mistura célula e meio de cultura, preparado no primeiro fluxo laminar (não é necessário fazer adsorção viral e não é necessário que as células estejam aderidas no fundo do frasco). Também foram adicionadas nas análises, amostras de sêmen não diluído (250 µL). Desse modo, pode-se inferir a toxicidade do sêmen *in natura* para as células KC, acompanhando-se a morfologia da monocamada e comparando-se o inóculo não diluído com o diluído. As células foram mantidas em incubadoras (LEEC, Nottingham, Reino Unido) a 28°C por 7 dias.

A análise da “citotoxicidade” foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico Nikon TMS (Chiyoda, Tóquio, Japão) com 24 e 48 horas. O meio de cultura foi trocado com 24 horas nas amostras em que as células apresentaram alteração de característica, como não fixação no fundo do frasco e arredondamento celular. As amostras para as quais as células não apresentaram

alteração, o meio de cultura foi trocado com 48 horas. Após sete dias, as células foram coletadas com o auxílio de um rodinho (Greiner Bio-One) e armazenadas em tubo tipo universal (Sterilin) a 4°C. As passagens cegas subsequentes em célula KC foram realizadas utilizando-se 1mL do inóculo anterior e a troca do meio somente foi realizada na primeira passagem.

### 3.6.2 Células BHK-21

Após a 3ª passagem em células KC, as amostras foram submetidas à extração de RNA como mostrado no passo 4.2.1.3 e analisadas por qRT-PCR como mostrado no passo 4.2.3, para verificar se houve multiplicação viral, uma vez que o BTV não apresenta efeito citopático (ECP) nas células KC. Amostras que foram positivas com *Ct.* abaixo de 35 foram submetidas ao cultivo celular utilizando BHK-21 e VERO. O meio de cultura utilizado para a manutenção de BHK-21 foi o *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM-Gibco), com 1% de antibiótico contendo penicilina e estreptomicina 10.000 U (Sigma- Aldrich) e 5% de caldo triptose-fosfato (TPB- Sigma-Aldrich), que foi preparado em fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific). Células BHK-21, em frascos médios T-75cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One), com 80% de confluência na monocamada celular foram utilizadas para a multiplicação viral e visualização de ECP induzido pelo BTV. O meio de cultura onde as células estavam sendo mantidas foi retirado por inversão e a monocamada foi lavada três vezes com meio de cultura suplementado. Após a lavagem foi adicionado 1 mL de inóculo da 3ª passagem em KC e incubado a 37°C (LEEC) por uma hora para a adsorção. Depois disso foram adicionados 23 mL do meio de cultura suplementado e mantido na incubadora (LEEC) a 37°C até o aparecimento de ECP. As amostras foram acompanhadas diariamente com o auxílio de um microscópio óptico invertido (Nikon). Depois foram coletadas com o auxílio de um rodinho (Greiner Bio-One) e armazenadas em tudo tipo universal (Sterilin) a 4°C.

### 3.6.3 Células VERO

Foi realizado o cultivo em células VERO (ATCC®CCL81™) após três passagens em células KC e resultado positivo em qRT-PCR, semelhante ao realizado para BHK-21. O meio de cultura utilizado foi o DMEM, *high glucose*, *GlutaMAX™*, *HEPES* (Gibco) suplementado com 1% de antibiótico contendo penicilina e estreptomicina 10.000U (Sigma-Aldrich) preparado em fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific). Frascos T-75cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One) contendo células VERO com 80% de confluência, tiveram a sua monocamada lavada por três vezes utilizando meio de cultura DMEM suplementado, em um diferente fluxo laminar classe II maxisafe 2020 (Thermo Scientific), seguida da adição de 1mL da 3ª passagem do sobrenadante de células KC, seguido de incubação por uma hora a 37°C em incubadora (LEEC). Transcorrido o tempo, 23 mL do meio DMEM suplementado foram adicionados aos frascos e os mesmos mantidos a 37°C até o aparecimento de CPE. As amostras foram acompanhadas diariamente com o auxílio de um microscópio óptico invertido (Nikon), e as amostras foram coletadas com o auxílio de um rodinho (Greiner Bio-One) e armazenadas em tubo tipo universal (Sterilin) a 4°C. Para os experimentos de inoculação, trabalhou-se sempre com um controle celular não inoculado, para o qual todos os passos de lavagem e troca de meios foram executados.

## 4 Resultados e discussão

### 4.1 RT-PCR *one-step*

Os resultados para as diferentes amostras e vírus são apresentados na tabela 3.3, destacando-se as amostras de sêmen por região geográfica. Na região da Zona da Mata foram coletadas amostras em Coronel Pacheco; na região do Vale do Mucuri, na cidade de Carlos Chagas; na região metropolitana, na cidade de Pedro Leopoldo; e no Triângulo Mineiro, na cidade de Ituiutaba. Das 53 amostras de sêmen analisadas, 21 (39,62%) foram positivas para BVDV e 24 (45,28%) foram positivas para BTV.

Tabela 3.3 Amostras de sêmen *in natura* testadas e coinfeção para BVDV e BTV.

Vírus/região gênica Cidade	Nº. de amostras testadas	Positivas para BVDV 5'-UTR	Positivas para BTV NS3	Coinfeção (BVDV + BTV)
Carlos Chagas	34	8 (23,53%)	15 (44,12%)	8 (23,53%)
Pedro Leopoldo	9	9 (100%)	4 (44,44%)	3 (33,34%)
Coronel Pacheco	4	3 (75%)	2 (50%)	2 (50%)
Ituiutaba	6	2 (33,34%)	3 (50%)	2 (33,34%)
<b>Total</b>	<b>53</b> <b>100%</b>	<b>21</b> <b>39,62%</b>	<b>24</b> <b>45,28%</b>	<b>15</b> <b>28,3%</b>

A coinfeção viral presente nas amostras testadas é mostrada na tabela 3.3. Observa-se a recorrência deste fenômeno uma vez que foi observada coinfeção nas amostras seminais coletadas nas quatro regiões geográficas testadas do Estado de Minas Gerais. A coinfeção entre BTV e o BVDV ocorreu em 15 (28,3%) das amostras de sêmen coletadas e testadas.

### 4.2 qRT-PCR *one-step*

Todas as amostras de sêmen testadas foram anteriormente avaliadas para a amplificação do normalizador GAPDH e todas foram positivas. As amostras foram testadas em duplicata e o resultado foi apresentado como a média do *Ct*, consideradas positivas amostras com média de  $Ct \leq 35$ , e acima desse valor foram consideradas inconclusivas. Das 53 amostras de sêmen fresco avaliadas para o vírus BVDV, observou-se que mais seis amostras foram positivas adicionalmente às que já haviam amplificado na RT-PCR *one-step* (21– 39,6% RT-PCR e 27– 50,9% qRT-PCR, respectivamente). Na tabela 3.4 podemos observar o valor do *Ct*, de acordo com a região. Para o vírus BTV, na qRT-PCR *one-step* oito amostras foram positivas adicionalmente às já anteriormente observadas, as quais não haviam amplificado na RT-PCR *one-step* (24– 44,28% RT-PCR e 32– 60,4% qRT-PCR), com valor de *Ct* menor que 35 (tabela

3.5). A qRT-PCR mostrou-se mais sensível, detectando o maior número de amostras comparado com a RT-PCR, ambas, *one-step*.

**Tabela 3.4 Valor do Ct. na qRT-PCR 5'UTR-BVDV em amostras de sêmen bovino.**

Cidade	Números de amostras analisadas	Amostras com Ct. menor que 35 (Positivas)	Amostras com Ct. maior que 35 (inconclusivas)	Amostras sem Ct. (negativas)
Carlos Chagas	34	12	15	7
Pedro Leopoldo	9	9	0	0
Coronel Pacheco	4	3	1	0
Ituiutaba	6	3	2	1
<b>Total</b>	53 (100%)	27 (50,95%)	18 (33,96%)	8 (15,09%)

**Tabela 3.5 Valor do Ct. na qRT-PCR NS3 (seg-10)-BTV em amostras de sêmen bovino.**

Cidade	Números de amostras analisadas	Amostras com Ct. menos que 35 (Positivas)	Amostras com Ct. maior que 35 (inconclusivas)	Amostras sem Ct. (negativas)
Carlos Chagas	34	21	11	2
Pedro Leopoldo	9	8	1	0
Coronel Pacheco	4	2	1	1
Ituiutaba	6	1	2	3
<b>Total</b>	53 (100%)	32 (60,37%)	15 (28,30%)	6 (11,33%)

#### 4.3 RT-PCR x qRT-PCR, análise de concordância

A análise de concordância (índice *Kappa*) entre os dois testes citados para BVDV foi de 0,70 e para BTV foi de 0,66, considerados de substancial concordância (de 0,6 a 0,79) (tabelas 3.6 e 3.7).

**Tabela 3.6 Análise dos resultados obtidos através das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR para BVDV em amostras de sêmen utilizando o índice *Kappa*.**

		qRT-PCR		
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	21	0	21
	Negativo	6	26	32
		27	26	Total 53
<b>BVDV Kappa 0,70</b>				

**Tabela 3.7 Análise dos resultados obtidos através das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR para BTV em amostras de sêmen utilizando o índice *Kappa*.**

		qRT-PCR		
		Positivo	Negativo	
RT-PCR	Positivo	24	1	25
	Negativo	8	20	28
		32	21	Total 53
<b>BTV <i>Kappa</i> 0,66</b>				

Dessa forma, pode se afirmar que os testes são concordantes e a sensibilidade analítica foi semelhante para todos os testes padronizados, pela análise *kappa*. Assim podem ser utilizados quaisquer dos testes com confiança e alta sensibilidade.

É importante destacar que ao longo do desenvolvimento deste trabalho pode ser observado que os resultados da sensibilidade analítica foram comparáveis para os dois testes (RT-PCR e qRT-PCR *one-step*) com valores muito próximos, utilizando-se como molde amostras de sêmen contaminadas com vírus, em doses infectantes conhecidas. Porém, nos testes de amostras de campo, as quais contêm doses variáveis de vírus, observou-se que a qRT-PCR foi mais sensível do que a RT-PCR, nas condições trabalhadas.

Considerando-se os vírus RNA de fita simples linear (BVDV) e RNA fita dupla segmentada (BTV), a ocorrência de “falso-negativos” na RT-PCR em relação à qRT-PCR foi de 11,3% e 16,12%, respectivamente. Provavelmente, estes dados estão correlacionados ao tipo de ácido nucleico e acessibilidade aos iniciadores, bem como ao desempenho da extração do ácido nucleico.

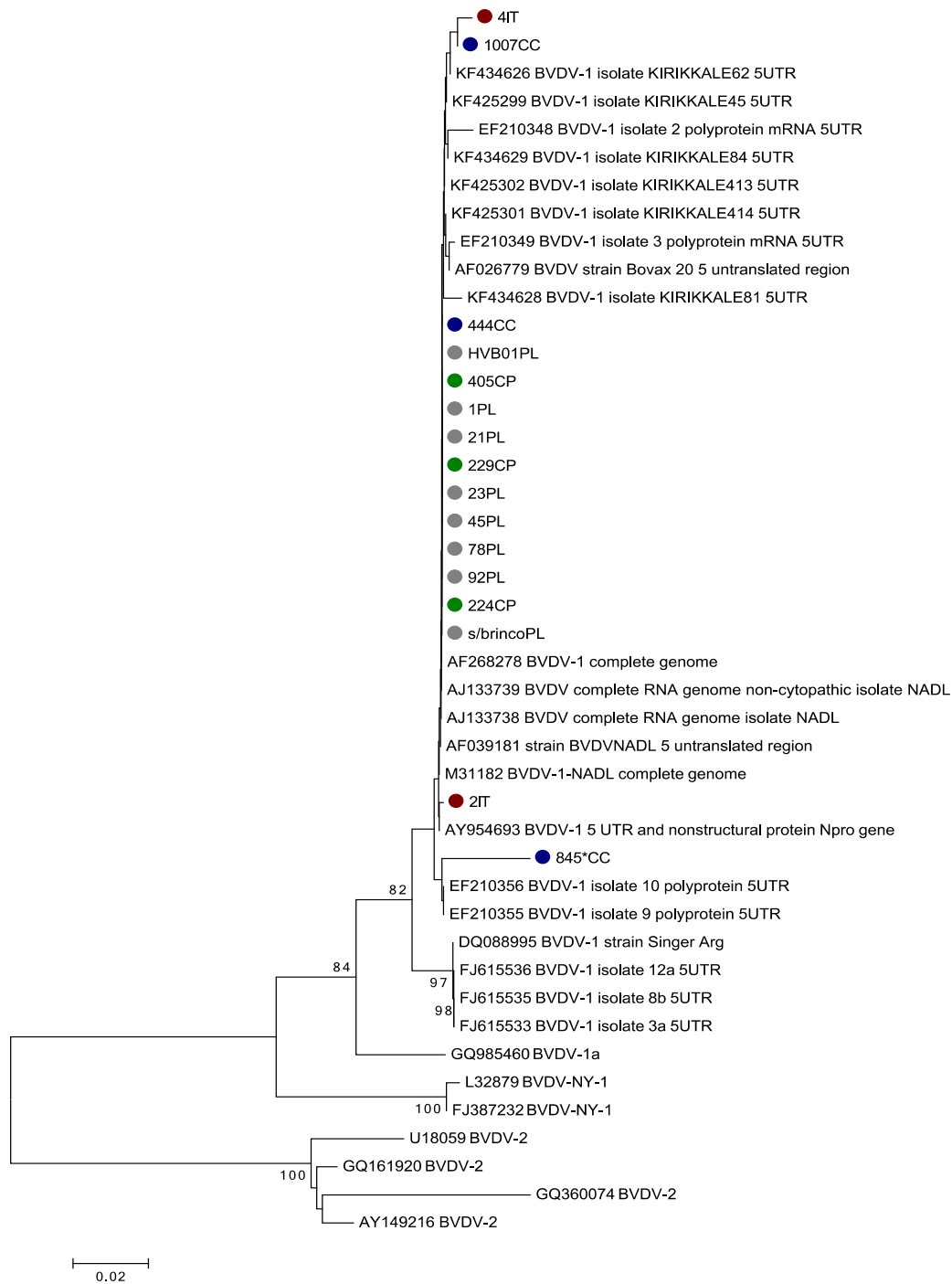
Devem, certamente, serem consideradas as seguintes vantagens da qRT-PCR: maior rapidez; teste de maior número de amostras em mesmo tempo; não existência da etapa de eletroforese, que não somente reduz o tempo de apresentação do resultado como também a chance de contaminação de amostras e do ambiente laboratorial. Entretanto, os testes aqui desenvolvidos deverão ser repassados à rede de laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e, nem todos os laboratórios que constituem a rede de apoio têm a infraestrutura física e de recursos humanos para o desenvolvimento da qRT-PCR; assim, o teste RT-PCR *one-step* para ambos os vírus mostraram resultados muito bons, passíveis de serem utilizados em locais onde falta a infraestrutura mencionada.

#### 4.4 Sequenciamento e Inferência filogenética

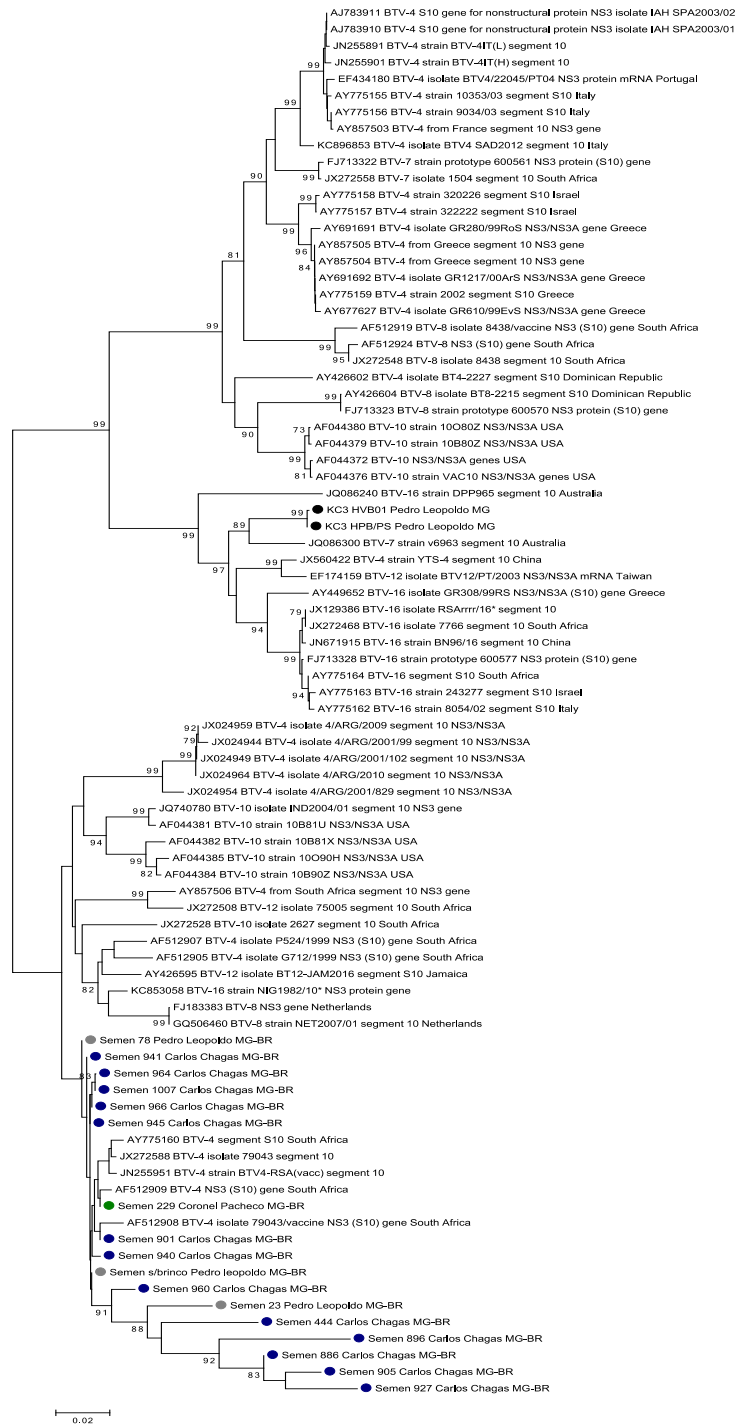
Foi realizado o sequenciamento de amostras virais provenientes de algumas amostras de sêmen *in natura* bovino, escolhidas dentre as que apresentaram uma maior amplificação, visualmente observada em corrida eletroforética em gel de agarose, possivelmente significando uma maior quantidade de vírus na amostra seminal escolhida. A purificação do material genômico foi realizada e o cDNA dosado e realizado o sequenciamento como descrito anteriormente (secção

4.1.6). Após conferência das sequências, resolução das ambiguidades e alinhamento com sequências virais previamente depositadas no *GenBank*, a partir do alinhamento no programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), foi efetuada a inferência filogenética utilizando o programa MEGA versão 5 (*Tamura K. et al., 2011*), como descrito na secção 3.5.3.

Pode-se observar na figura 3.2 a aproximação das amostras sequenciadas para BVDV. As sequências ficaram mais próximas do BVDV-1. Na figura 3.3, pode-se observar na análise filogenética do BTV, utilizando a região NS3, que não foi possível diferenciar os sorotipos. As amostras agruparam próximas da amostra de BTV-4 da África do Sul. As sequências das amostras padrão foram provenientes de depósitos no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).



**Figura 3.2: Análise filogenética de BVDV com seqüências amplificadas por RT-PCR e seqüenciadas à partir de amostras de sêmen de animais naturalmente infectados.** Árvore de *Neighbor-Joining* da seqüência não transcrita 5'(UTR-5'). A árvore foi feita utilizando-se a distância *p* com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA 5. Círculo azul representa amostras de sêmen coletadas em Carlos Chagas, círculo cinza em Pedro Leopoldo, círculo verde Coronel Pacheco e círculo vermelho Ituiutaba.



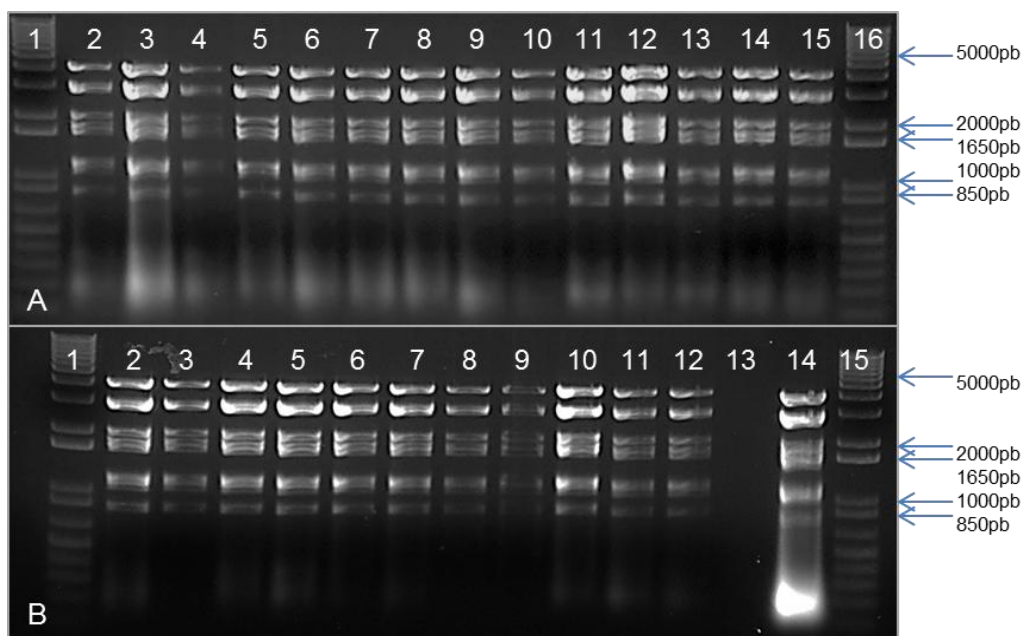
**Figura 3.3: Análise filogenética de BTV com sequências amplificadas por RT-PCR e sequenciadas a partir de amostras de sêmen de animais naturalmente infectados. Árvore de Neighbor-Joining das sequências codificadoras da região NS3. A árvore foi feita utilizando-se a distância p com 1000 réplicas de bootstrap, utilizando-se o programa MEGA 5. O círculo azul representa amostras de sêmen coletadas em Carlos Chagas, círculo cinza em Pedro Leopoldo e círculo verde Coronel Pacheco.**



## 5 Resultados obtidos em Pirbright

### 5.1 Extração de RNA viral das amostras de referência

Foram realizadas a multiplicação e a extração do RNA viral de todos os tipos de BTV para controle positivo, tanto para a RT-PCR quanto para a qRT-PCR. O método escolhido foi o do TRIzol com modificações, com adição de um passo adicionando-se cloreto de lítio para a separação de RNA fita simples do RNA fita dupla. Este passo foi importante para a purificação do RNA, que posteriormente além de ser utilizado como controle positivo da PCR, também foi utilizado para sequenciamento genômico. Na figura 3.4, pode-se visualizar um gel de agarose 1% comprovando a qualidade do RNA extraído. A banda maior é referente ao gene do seg-1 (VP1) com tamanho molecular de 3,954 Kb. Abaixo o gene do seg-2 (VP2) e seg-3 (VP3) juntos, com tamanho molecular de 2,926 Kb e 2,770 Kb, respectivamente. Posteriormente, o gene do seg-4 (VP4), seg-5 (NS1) e seg-6 (VP5), com tamanho molecular de 1,981Kb, 1,769Kb e 1,638Kb, respectivamente. Logo abaixo, o gene do seg-7 (VP7), seg-8 (NS2) e seg-9 (VP6), com tamanho molecular de 1,156 Kb, 1,124 Kb e 1,046 Kb, respectivamente. A menor banda corresponde ao gene do seg-10 que codifica a proteína não estrutural NS3 de tamanho molecular de 0,822 Kb. Todos os RNAs extraídos estão em quantidade e qualidade adequados para trabalhos posteriores.



**Figura 3.4: RNA dos 25 tipos de BTV extraídos pelo método TRIzol.** Gel de agarose 1% (Invitrogen), corado com brometo de etídio (Promega), visualizado e fotografado em Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (Biorad). *Figura A:* Canaleta 1 e 16 padrão de tamanho molecular 1Kb plus (Invitrogen); Canaletas 2-15 BTV-1, BTV-2, BTV-3, BTV-3 (nova extração), BTV-4, BTV-5, BTV-6, BTV-7, BTV-8, BTV-9, BTV-10, BTV-11, BTV-12 e BTV-13, respectivamente. *Figura B:* Canaleta 1 e 15 padrão de tamanho molecular 1Kb plus (Invitrogen); Canaletas 2-14: BTV-14, BTV-15, BTV-16, BTV-17, BTV-18, BTV-19, BTV-20, BTV-21, BTV-22, BTV-23, BTV-24, Vazia e BTV-26, respectivamente.

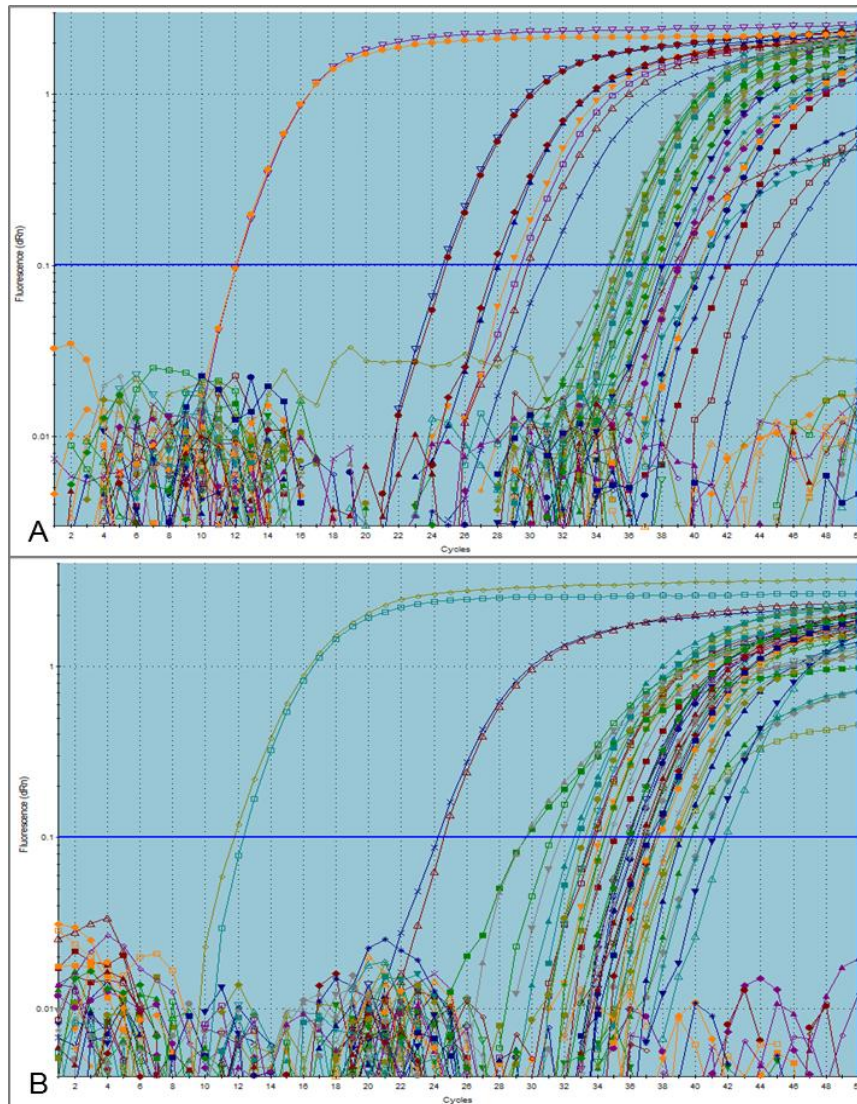
## 5.2 qRT-PCR

Os resultados da qRT-PCR para seg-10 (NS3) podem ser verificados na tabela 3.8 e na figura 3.5, onde pode-se analisar a curva de amplificação da qRT-PCR para as 50 amostras de sêmen testadas. Amostras com *Ct.* menor que 35 foram observadas nas fazendas de todos os municípios, menos em Ituiutaba, que apresentaram resultados inconclusivos (2) e sem *Ct.* (3), neste teste. O BTV é um vírus não envelopado, contendo capsídeo com tripla camada, não sendo considerado entre os vírus mais susceptíveis à estocagem. Porém, embora as amostras tenham saído do Brasil em contêiner apropriado com gelo seco, sofreram uma retenção alfandegária em Campinas, embora a documentação legal estivesse anexada (anexo 6) e chegaram ao Instituto Pirbright no Reino Unido à temperatura ambiente. O transporte pode ter contribuído para a não adequação das amostras tanto para os ensaios de PCR, como, especialmente, para o isolamento viral.

**Tabela 3.8 Diagnóstico de BTV em amostras de sêmen utilizando qRT-PCR (seg-10).**

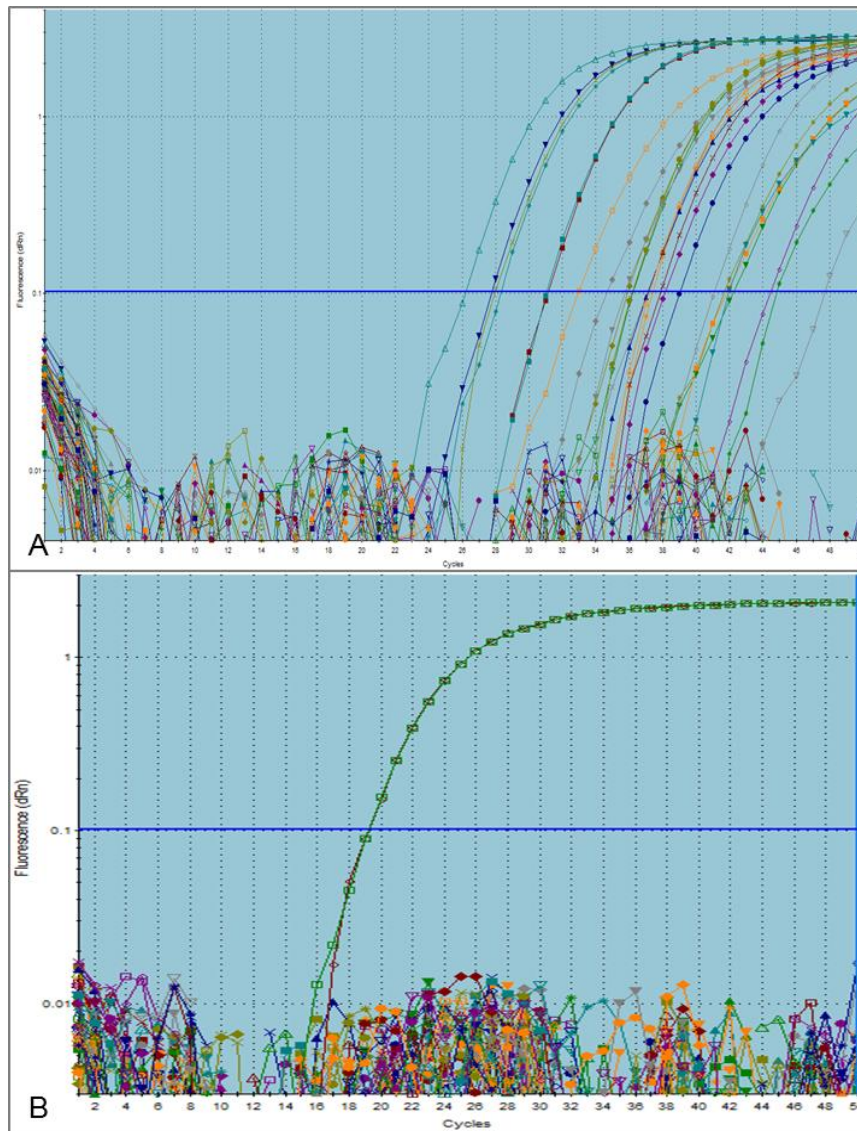
Cidade	Números de amostras analisadas	Amostras com <i>Ct.</i> menor que 35 (Positivas)	Amostras com <i>Ct.</i> maior que 35 (Inconclusivas)	Amostras sem <i>Ct.</i> (negativas)
Carlos Chagas	33	12	16	5
Pedro Leopoldo	8	5	3	0
Coronel Pacheco	4	2	1	1
Ituiutaba	5	0	2	3
<b>Total</b>	50 (100%)	19 (38%)	22 (44%)	9 (18%)

Se compararmos os resultados obtidos, utilizando métodos de extração do RNA semelhantes (BR-Tri-reagente [Sigma] e UK-TRIZol [Invitrogen]) e iniciadores para a mesma região gênica (seg-10-NS3). Dos experimentos realizados no Brasil (tabela 3.5), das 53 amostras testadas, 32 foram positivas com *Ct.* menor que 35, 15 com *Ct.* maior que 35 (inconclusivas) e 6 negativas. Na tabela 3.8 pode-se observar o resultado produzido no UK, no total de 50 amostras, 19 foram positivas com *Ct.* menor que 35, 22 amostras inconclusivas e 9 negativas. É relevante destacar ainda, que para os animais dos municípios analisados, a detecção foi positiva tanto pelo teste desenvolvido no Laboratório do ICB-UFMG, quanto pelo teste utilizado em Pirbright, excetuando para as amostras coletadas na região de Ituiutaba. A maior variação se deveu aos testes inconclusivos. Importante ressaltar que os reagentes utilizados foram diferentes. No Brasil a qRT-PCR *one-step* foi utilizado o *Sybr Green* (Applied Biosystems), enquanto que na Inglaterra foi utilizado o sistema *TaqMan* (Invitrogen). A especificidade do sistema *TaqMan* é maior do que o *Sybr Green*, devido à utilização de sonda. Já no *Sybr Green*, o corante se liga em qualquer DNA de fita dupla. A diferença observada nos resultados obtidos entre dois qRT-PCR *one-step* pode estar relacionada aos diferentes reagentes utilizados para o desenvolvimento do teste diagnóstico e ao uso de sonda em Pirbright.



**Figura 3.5: Curva teste de amplificação de BTV (seg-10) por qRT-PCR a partir de amostras de sêmen (Orru *et al.*, 2006).** Foram utilizados para a reação a enzima *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen) e TRIZOL LS como método de extração. *Figura A e B:* Curva de amplificação da qRT-PCR nos testes das 50 amostras de sêmen em duplicata, onde a curva com o menor valor de *Ct*. é o controle positivo, e as outras curvas foram geradas pelas amostras de sêmen.

Trabalhos anteriormente publicados apontam que o primeiro tipo de BTV isolado no Brasil foi o BTV-4, a partir de sangue de animais brasileiros, em quarentena nos Estados Unidos da América (Grocock & Campbell, 1982). Posteriormente, o BTV-12 foi isolado em um surto no Paraná em 2001 (Clavijo *et al.*, 2002). Trabalhos somente utilizando sorologia indicam outros tipos de BTV circulantes no Brasil, como o 4, 6, 14, 17, 19 e 20 (Grocock & Campbell, 1982; Cunha *et al.*, 1987). Foram utilizados iniciadores específicos utilizando o gene do seg-2 para a amplificação em qRT-PCR. As amostras foram testadas para BTV-4, 12, 2, 6, 14 e 17. A figura 3.6 representa a curva de amplificação da qRT-PCR para BTV-4 e BTV-12, figuras A e B, respectivamente.



**Figura 3.6: Curva de amplificação de BTV-4 e BTV-12 (seg-2) por qRT-PCR, a partir de amostras de sêmen.** Foram utilizadas a enzima *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen) e TRIZOL LS como método de extração. As amostras foram testadas para o segmento 2. *Figura A:* Curva de amplificação da qRT-PCR BTV-4 seg-2 para as 50 amostras de sêmen em duplicata; a amostra com o menor *Ct*, representa o controle positivo, e, as amostras de sêmen mostraram *Ct*'s variados. *Figura B:* Curva de amplificação da qRT-PCR BTV-12 seg-2 para as 50 amostras de sêmen em duplicata. Observou-se amplificação somente para o controle positivo.

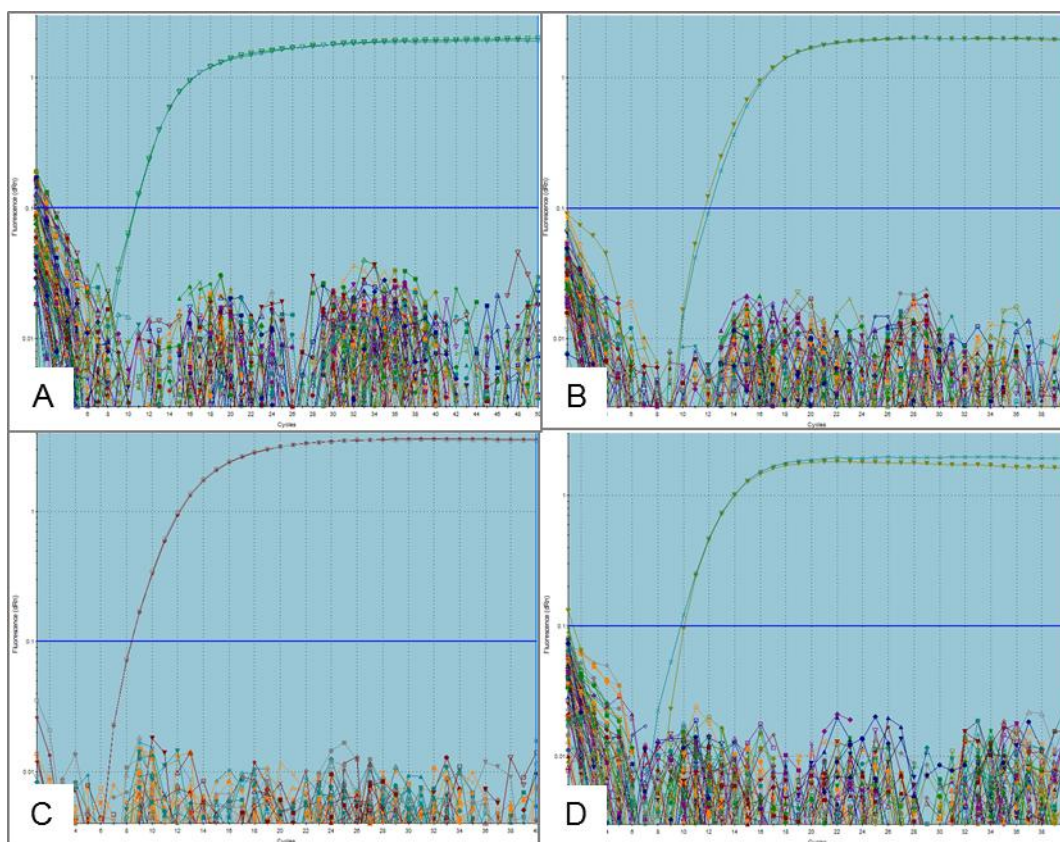
Houve detecção de fluorescência para o controle positivo em ambos os testes e nove amostras de sêmen apresentaram *Ct* menor que 35 na qRT-PCR para BTV-4. Como pode ser observado na tabela 3.9, somente para a cidade de Ituitaba não houve amostras positivas e nem inconclusivas, sendo, portando todos os animais negativos. Não foi observado fluorescência nas amostras de sêmen para BTV-12.



**Tabela 3.9 Amostras de sêmen positivas para BTV-4.**

Cidade	Números de amostras analisadas	Amostras com Ct. menos que 35 (Positivas)	Amostras com Ct. maior que 35 (Inconclusivas)	Amostras sem Ct. (Negativas)
Carlos Chagas	33	3	12	18
Pedro Leopoldo	8	4	2	2
Coronel Pacheco	4	2	1	1
Ituiutaba	5	0	0	5
<b>Total</b>	50 (100%)	9 (18%)	15 (30%)	26 (52%)

Na figura 3.7 pode ser observado a curva de amplificação na qRT-PCR para BTV-2, BTV-6, BTV-14 e BTV-17. Pode-se observar que somente houve amplificação nos controles positivos. As amostras de sêmen e os controles negativos não apresentaram valor de Ct.



**Figura 3.7: Curva de amplificação de BTV-2, BTV-6, BTV-14 e BTV-17 (seg-2) por qRT-PCR, a partir de amostras de sêmen.** Foram utilizadas a enzima *SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System* (Invitrogen) e TRIZOL LS como método de extração. *Figura A:* Curva de amplificação da qRT-PCR BTV-2 seg-2 nos testes das 50 amostras de sêmen em duplicata; *Figura B:* Curva de amplificação da qRT-PCR BTV-6 seg-2 nos testes das 50 amostras de sêmen em duplicata; *Figura C:* Curva de amplificação da qRT-PCR BTV-14 seg-2 nos testes das 50 amostras de sêmen em duplicata; *Figura D:* Curva de amplificação da qRT-PCR BTV-17 seg-2 nos testes das 50 amostras de sêmen em duplicata; Em todos os testes somente os controles positivo amplificaram e os controles negativos não apresentaram valor de Ct.

Como apresentado acima, e, segundo os relatos brasileiros, optou-se inicialmente por testar as amostras para BTV-4 e BTV-12, anteriormente isoladas em amostras brasileiras. Em seguida, as amostras foram testadas para BTV-6, BTV-14 e BTV-17 (devido aos resultados de sorologia no Brasil e América do Sul; Legisa *et al*, 2013; Cunha *et al.*,1987) e, para o BTV-2, devido a recente surto descrito na América Central (dados ainda não relatados, com avaliação em andamento no Instituto Pirbright). Estes testes realizados consumiram a quase totalidade do material enviado ao Instituto e, novos testes não puderam ser realizados. Destaca-se aqui que as amostras precisam ainda ser testadas em duplicata, reduzindo ainda mais o rendimento do material enviado.

### 5.3 Isolamento viral

Amostras de sêmen que apresentaram *Ct.* abaixo de 35 foram submetidas a isolamento viral utilizando primeiramente células KC. Como não há relato na literatura sobre isolamento viral nessas células utilizando sêmen como material biológico, foram inicialmente testadas diferentes diluições do sêmen. Na tabela 3.10, podemos analisar o cultivo em células KC de culicídeos utilizando 12 amostras de sêmen em diferentes diluições. Em algumas amostras ocorreu a morte celular em 24 horas, enquanto para outras, com a mesma diluição, houve adesão celular, evidenciando baixa citotoxicidade. A concentração espermática foi ajustada para  $10^6$  células espermáticas /500  $\mu$ L (quantidade de célula espermática utilizada na inseminação artificial). Consequentemente a quantidade de PBS utilizada para diluir as mesmas foi variável, fator que pode ter contribuído para a citotoxicidade e morte celular.

Para a amostra de número 5, por exemplo, a concentração espermática inicial estava muito baixa e a quantidade de diluente utilizado foi menor, portanto a concentração do plasma seminal estava maior do que em outras amostras testadas. Foi testado o isolamento viral somente utilizando o plasma seminal sem diluição e as células tornaram-se inviáveis em 24 horas. O sucesso ou não do isolamento viral para amostra de sêmen está diretamente relacionado à concentração espermática inicial e, conseqüentemente, ao volume de diluente utilizado, lembrando que o plasma seminal possui uma grande quantidade de lipídeos, proteínas e sais, que dificulta ainda mais o isolamento viral em célula. Fiore (1997), também observou a citotoxicidade do plasma seminal em cultura de linfócitos e também relatou que a presença de SFB aumenta ainda mais a citotoxicidade celular.

Como pode ser observado na tabela 3.10, amostras que foram pouco diluídas com PBS após a contagem espermática apresentaram morte celular em 24h, enquanto amostras com a quantidade maior de diluente obtiveram maior sucesso no isolamento viral. Nesse sentido, amostras de sêmen foram coletadas de touros de diferentes idades, com comprimento, largura, volume e circunferência escrotal que variam amplamente entre os animais coletados e conseqüentemente, a quantidade de material coletado. Argov-Argaman e colaboradores (2013) encontraram uma diferença na concentração de lipídeos de acordo com a idade do touro. Touros maduros possuem uma menor concentração de lipídeo no sêmen. Amostras biológicas com alto teor de lipídeos, quando adicionadas ao cultivo celular, geralmente causam citotoxicidade. Esse fator pode explicar a diferença de citotoxicidade encontrado nesse trabalho para as diferentes amostras de sêmen.

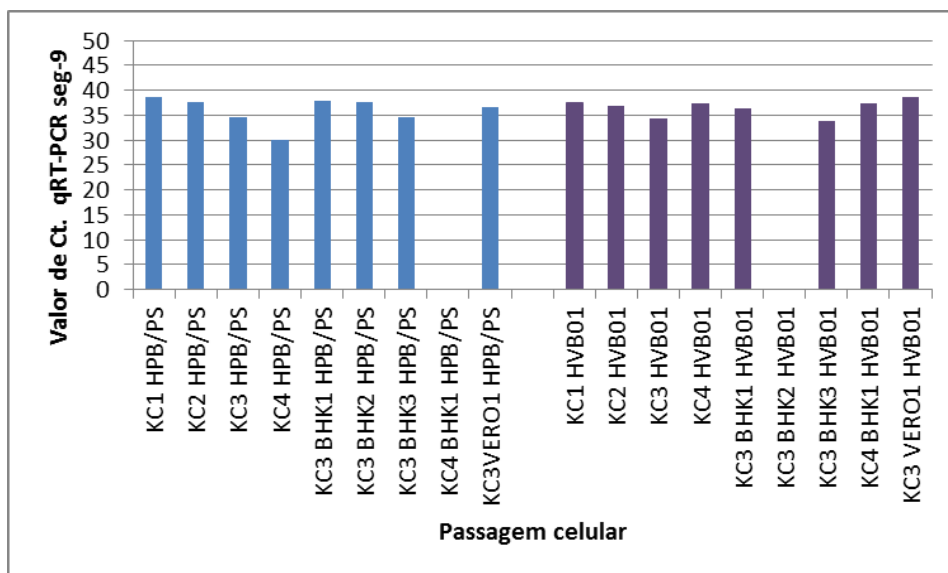
**Tabela 3.10 Análise da citotoxicidade celular e valor de Ct. na qRT-PCR seg-9.**

Amostra	905		405		78		444	
diluição	s/diluir	1:5	s/diluir	1:5	s/diluir	1:5	s/diluir	1:5
24H	↓AC	↓AC	↑AC	↑AC	↑AC	↑AC	↑AC	↑AC
48H	MC	MC	AC	AC	AC	AC	AC	AC
Ct. KC2			S/Ct.	S/Ct.	S/Ct.	S/Ct.	S/Ct.	S/Ct.
Ct. KC3			S/Ct.	S/Ct.	38.51	S/Ct.	S/Ct.	S/Ct.
Amostra	886				896			
diluição	s/diluir	1:5	1:10	1:20	s/diluir	1:5	1:10	1:20
24H	MC	MC	MC	↓AC	MC	MC	↓AC	↑AC
48H				AC			AC	AC
Ct. KC2				S/Ct.			S/Ct.	S/Ct.
Ct. KC3				S/Ct.			S/Ct.	S/Ct.
Amostra	4				5			
diluição	s/diluir	1:5	1:10	1:20	s/diluir*	1:5	1:10	1:20
24H	MC	MC	↓AC	↓AC	MC	MC	MC	↓AC
48H			MC	MC				MC
Amostra	Holandês	S/brinco		HPB/PS		HVB01		
diluição	1:5	1:5		1:5		1:5		
24H	↓AC	↓AC		↑AC		↑AC		
48H	MC	MC		AC		AC		
Ct. KC2				37.61		36.99		
Ct. KC3				<b>34.54</b>		<b>34.22</b>		

↓AC- Baixa Adesão Celular; ↑AC- Alta Adesão Celular; MC-Morte celular; \*Adicionado somente plasma seminal; KC2: Segunda passagem; KC3: Terceira passagem; Ct.: Valor do Ct. em qRT-PCR seg-9.

Posteriormente à primeira passagem, as amostras que permaneceram viáveis durante sete dias foram submetidas a uma segunda passagem em célula KC (KC2). Após passado o tempo de incubação de sete dias, as células foram coletas e submetidas a uma terceira passagem em células KC (KC3). Foi realizado também a extração de RNA com robô KingFisher e a qRT-PCR utilizando iniciadores para o seg-9 para acompanhar a multiplicação viral. O mesmo procedimento ocorreu depois de passado o tempo de incubação da terceira passagem. Nesta etapa o seg-9 foi utilizado somente para avaliar a positividade das amostras, não tendo o mesmo potencial para a tipagem. Este segmento é o utilizado normalmente para este fim no Instituto Pirbright. Diferentemente, para a avaliação das amostras de sêmen diretamente (item 5.2) foi utilizado o seg-10 (codificador da NS3), unicamente porque no Brasil o sêmen havia sido testado com o mesmo, e facilitaria as análises comparativas.

Somente duas amostras apresentaram Ct. menor que 35 na terceira passagem e elas foram submetidas a uma quarta passagem em células KC (KC4) e depois, foram iniciadas as passagens em células de mamífero. A primeira célula utilizada foi a BHK-21. Foram realizadas três passagens nessas células utilizando KC3 como inóculo inicial e também foi realizada passagem em células VERO. Todas as passagens em cultivo de células realizadas foram submetidas à extração de RNA utilizando o robô KingFisher e, posteriormente, foi realizada a qRT-PCR utilizando o seg-9. Os resultados podem ser observados na figura 3.8.



**Figura 3.8: Comparação do valor do Ct. na qRT-PCR (seg-9) para amostras que foram cultivadas em célula de inseto (KC) e células de mamíferos BHK-21 e VERO.** As barras azuis representam amostra do sêmen do touro HPB/PS com suas passagens em célula e as barras roxas representam o amostra do sêmen do animal HVB01, ambos da cidade de Pedro Leopoldo. Houve diminuição do valor de Ct. nas passagens em células de inseto KC, e em uma amostra (HPB/PS) também houve diminuição do valor de Ct. em célula BHK-21.

Como pode ser observado, o valor de Ct. foi diminuindo com as passagens em células KC para ambos os isolados, sugerindo multiplicação viral em passagens subsequentes. O mesmo não foi observado nas passagens em células de mamíferos. Para o isolado HPB/PS pode-se observar uma diminuição no valor de Ct. nas passagens em células de mamífero BHK-21, mas o mesmo não foi observado com o isolado HVB01. Foi realizado somente uma passagem em células VERO. Nenhuma amostra apresentou ECP na monocamada celular.

#### 5.4 qRT-PCR dos isolados de sêmen

A partir de células de inseto KC, onde foram realizadas três passagens cegas (KC3), o RNA foi extraído com o kit da Qiagen para os isolados HPB/PS e HVB01. Em seguida foi realizada a qRT-PCR com iniciadores específicos para cada tipo de BTV utilizando o seg-2. Para estes isolados foi possível realizar a qRT-PCR para todos os 26 sorotipos de BTV (tabela 3.11). A amostra HPB/PS foi positiva com Ct. menor do que 35 para BTV-4, 8, 10 e 16, e inconclusivo para BTV-7 e 12, com média de Ct. de 37.18 e 37.24, respectivamente. O isolado HVB01 foi positivo para BTV-4 e 10 com Ct. menor que 35 e para os BTV-7 e 8 com Ct. inconclusivo (maior do que 35). Importante ressaltar que a amostra HPB/PS não possui células espermáticas, somente plasma seminal e a amostra HVB01 possuía os dois componentes, células espermáticas e plasma seminal.

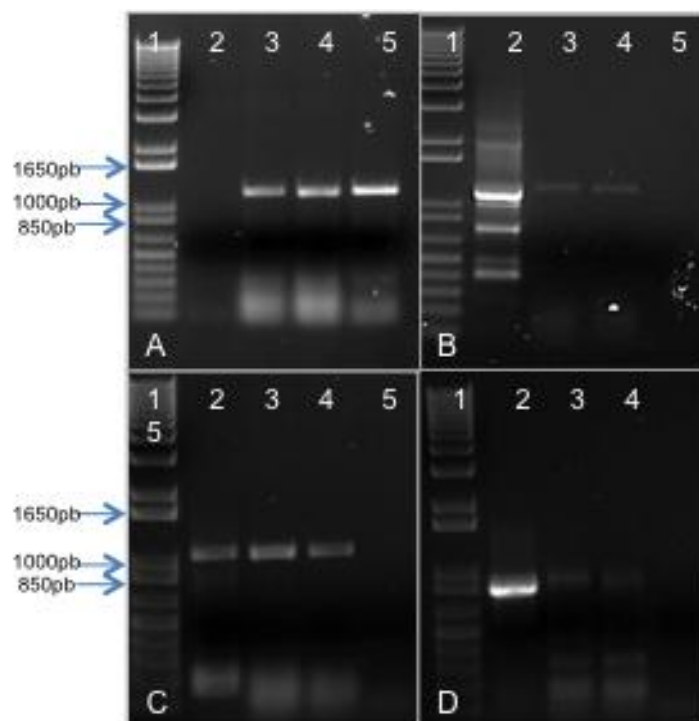


**Tabela 3.11 Valor de Ct. na qRT-PCR para tipagem de BTV utilizando o seg-2.**

Tipo BTV	HPB/PS (Sêmen)	HVB01 (Sêmen)	HPB/PS (KC3)	HVB01 (KC3)
BTV-1			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-2	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-3			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-4	32.97	27.77	<b>31.12</b>	<b>29.64</b>
BTV-5			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-6	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-7			<b>37.18</b>	<b>36.42</b>
BTV-8			<b>35.09</b>	<b>36.15</b>
BTV-9			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-10			<b>34.91</b>	<b>34.77</b>
BTV-11			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-12	Sem Ct.	Sem Ct.	<b>37.24</b>	Sem Ct.
BTV-13			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-14	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-15			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-16			<b>28.13</b>	Sem Ct.
BTV-17	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-18			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-19			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-20			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-21			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-22			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-23			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-24			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-25			Sem Ct.	Sem Ct.
BTV-26			Sem Ct.	Sem Ct.

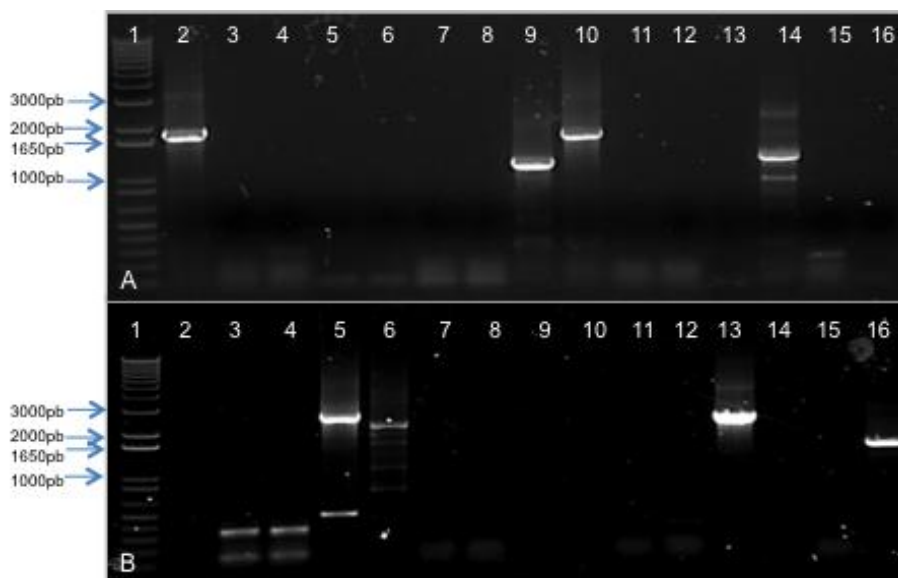
### 5.5 RT-PCR e Análise filogenética

As duas amostras com Ct. menor do que 35 no isolamento viral, utilizando células KC (HPB/PS e HVB01), foram submetidas primeiramente à RT-PCR com iniciadores que amplificam todo o gene dos segmentos 7, 8, 9 e 10, como mostra a figura 3.9. Foi possível amplificar os segmentos dos dois isolados com banda única. Todos os controles positivos amplificaram no tamanho esperado.



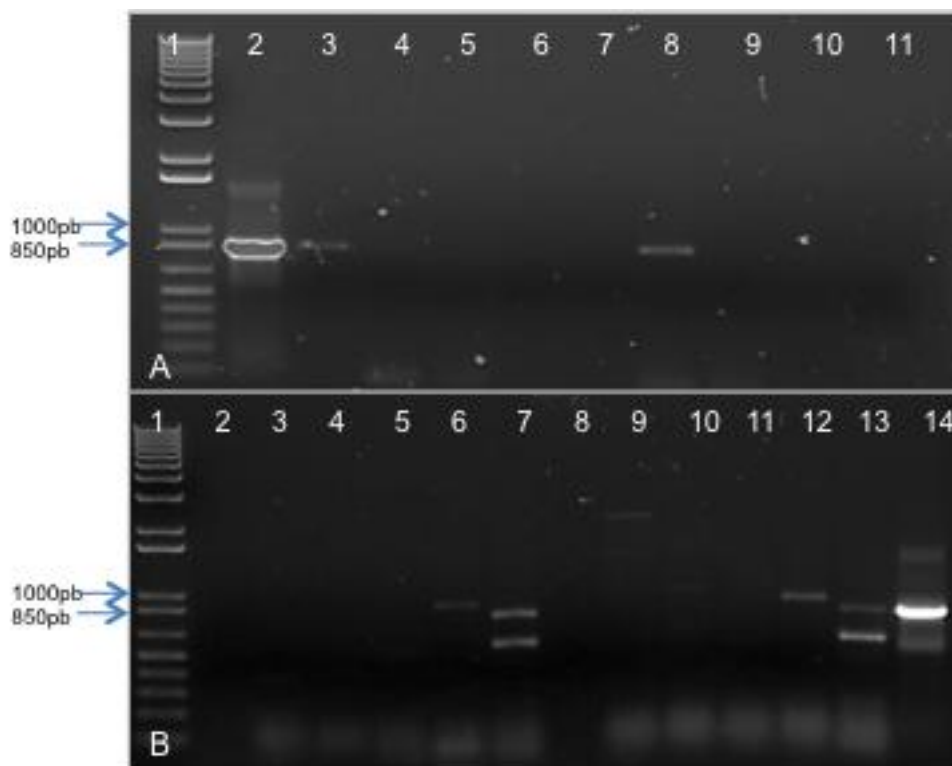
**Figura 3.9: RT-PCR para amplificação dos seg-7, seg-8, seg-9 e seg-10.** Gel de agarose 1% (Invitrogen), corado com brometo de etídio (Promega), visualizado e fotografado em Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (Biorad). *Figura A:* Canaleta 1 padrão de tamanho molecular 1 Kb *plus* (Invitrogen); Canaletas 2-5: controle negativo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle positivo seg-7 (~1156pb), respectivamente. *Figura B:* Canaleta 1 padrão de tamanho molecular 1 Kb *plus* (Invitrogen), canaletas 2-5: controle positivo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle negativo seg-8 (~1124 pb), respectivamente. *Figura C:* Canaleta 1 padrão de tamanho molecular 1 Kb *plus* (Invitrogen), canaletas 2-5: controle positivo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle negativo seg-9 (~1046 pb), respectivamente. *Figura D:* Canaleta 1 padrão de tamanho molecular 1 Kb *plus* (Invitrogen), canaletas 2-5: controle positivo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle negativo seg-10 (~822 pb), respectivamente.

Foram feitas tentativas de amplificação dos tipos de BTV considerados positivos e inconclusivos na qRT-PCR para tipagem utilizando iniciadores do seg-2. Foram utilizados diferentes pares de iniciadores específicos para cada tipo de BTV seg-2, e, na figura 3.10 pode-se observar o resultado da RT-PCR para BTV-4, BTV-7, BTV-8, BTV-10, BTV-12 e BTV-16.



**Figura 3.10: RT-PCR para amplificação do BTV-4, BTV-7, BTV-8, BTV-10, BTV-12, BTV-16 seg-2.** Gel de agarose 1% (Invitrogen), corado com brometo de etídio (Promega), visualizado e fotografado em Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (Biorad). *Figura A* - canaleta 1: padrão de tamanho molecular 1Kb *plus* (Invitrogen); Canaletas 2-5: controle positivo BTV-7 seg-2, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle negativo (1798pb), respectivamente; Canaletas 6-9: controle negativo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle positivo BTV-8 seg-2 (1232pb), respectivamente; Canaletas 10-13: controle positivo BTV-10 seg-2, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle negativo (1809 pb), respectivamente; Canaletas 14-16: controle positivo BTV-12 seg-2, KC3HPB/PS e controle negativo (1326 pb), respectivamente. *Figura B* - Canaleta 1: padrão de tamanho molecular 1Kb *plus* (Invitrogen); Canaletas 2-5: controle negativo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle positivo BTV-4 seg-2 par de iniciadores número 1 (2441 pb), respectivamente; Canaletas 6-9: controle positivo BTV-4 seg-2, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle negativo, utilizando par de iniciadores número 2 (2045 pb), respectivamente; Canaletas 10-13: controle negativo, KC3HPB/PS, KC3HVB01 e controle positivo BTV-4 seg-2 par de iniciadores número 3 (2324 pb), respectivamente; Canaletas 14-16: controle negativo, KC3HPB/PS e controle positivo BTV-16 seg-2 (1557 pb), respectivamente.

Não houve amplificação do seg-2 (segmento utilizado para sequenciamento) para o BTV-7 (1798 pb), BTV-8 (1232 pb), BTV-10 (1809 pb), BTV-4 seg-2 (par de iniciadores número 1 [2441 pb], par de iniciadores número 2 [2045 pb] e par de iniciadores número 3 [2324 pb]). Também não houve amplificação para BTV-12 (1326pb) e BTV-16 (1557 pb), para a amostra HPB/PS. O resultado negativo nesse teste pode ser devido ao valor do *Ct*. na qRT-PCR, que foi alto para ambas as amostras, mostrando que a quantidade de vírus presente na amostras não foi suficiente para a amplificação na RT-PCR. Das amostras positivas na qRT-PCR para tipagem, somente as amostras positivas para BTV-16 e BTV-4 mostraram o valor de *Ct*. suficientemente baixo para a amplificação na RT-PCR para sequenciamento. Na figura 3.11 pode-se observar outra tentativa de amplificação do BTV-4 seg-2 utilizando tanto a partir de amostras de sêmen quanto de isolados virais.

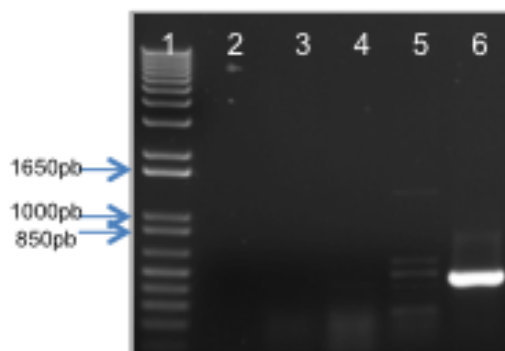


**Figura 3.11: RT-PCR para amplificação do BTV-4 seg-2.** Gel de agarose 1% (Invitrogen), corado com brometo de etídio (Promega), visualizado e fotografado em Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (Biorad). *Figura A* - Canaleta 1: padrão de tamanho molecular 1Kb *plus* (Invitrogen); Canaleta 2: Controle positivo BTV-4 seg-2; Canaletas 3-6: amostra de sêmen HVB01 e canaletas 8-11: amostra de sêmen 78, com par de iniciadores 1 (837 pb), par de iniciadores 2 (929 pb), par de iniciadores 3 (1071 pb) e par de iniciadores 4 (1105 pb) para cada amostra respectivamente; Canaleta 7: controle negativo da reação. *Figura B* - Canaleta 1: padrão de tamanho molecular; Canaletas 2 e 8 controle negativo da reação; Canaletas 3-7: isolado KC3HPB/PS e canaletas 9-13: isolado KC3HVB01, com par de iniciadores 1 (1105pb), par de iniciadores 2 (1105 pb), par de iniciadores 3 (1071 pb), par de iniciadores 4 (929 pb) e pares de iniciador 5 (837 pb), para cada amostra respectivamente; Canaleta 14 controle positivo BTV-4 seg-2 utilizando iniciadores de numero 5.

Houve amplificação de RNA viral para as amostras de sêmen 78 e HVB01 para BTV-4 seg-2 utilizando o par de iniciadores 1 (837 pb), portanto não houve amplificação com os outros par de iniciadores (par de iniciadores 2 [929 pb], par de iniciadores 3 [1071 pb] e par de iniciadores 4 [1105 pb]). Pode-se observar que a quantidade do RNA só foi suficiente para amplificar utilizando os par de iniciador número 1, que possui o menor comprimento entre os pares de iniciadores testados. O mesmo fenômeno ocorreu com os isolados HPB/PS e HVB01, para os quais foram utilizados cinco pares de iniciadores (par de iniciadores 1 [1105 pb], par de iniciadores 2 [1105 pb], par de iniciadores 3 [1071 pb], par de iniciadores 4 [929 pb] e par de iniciadores 5 [837 pb]), e só foi possível amplificar com os par de iniciadores número 4 e 5, para ambos os isolados.

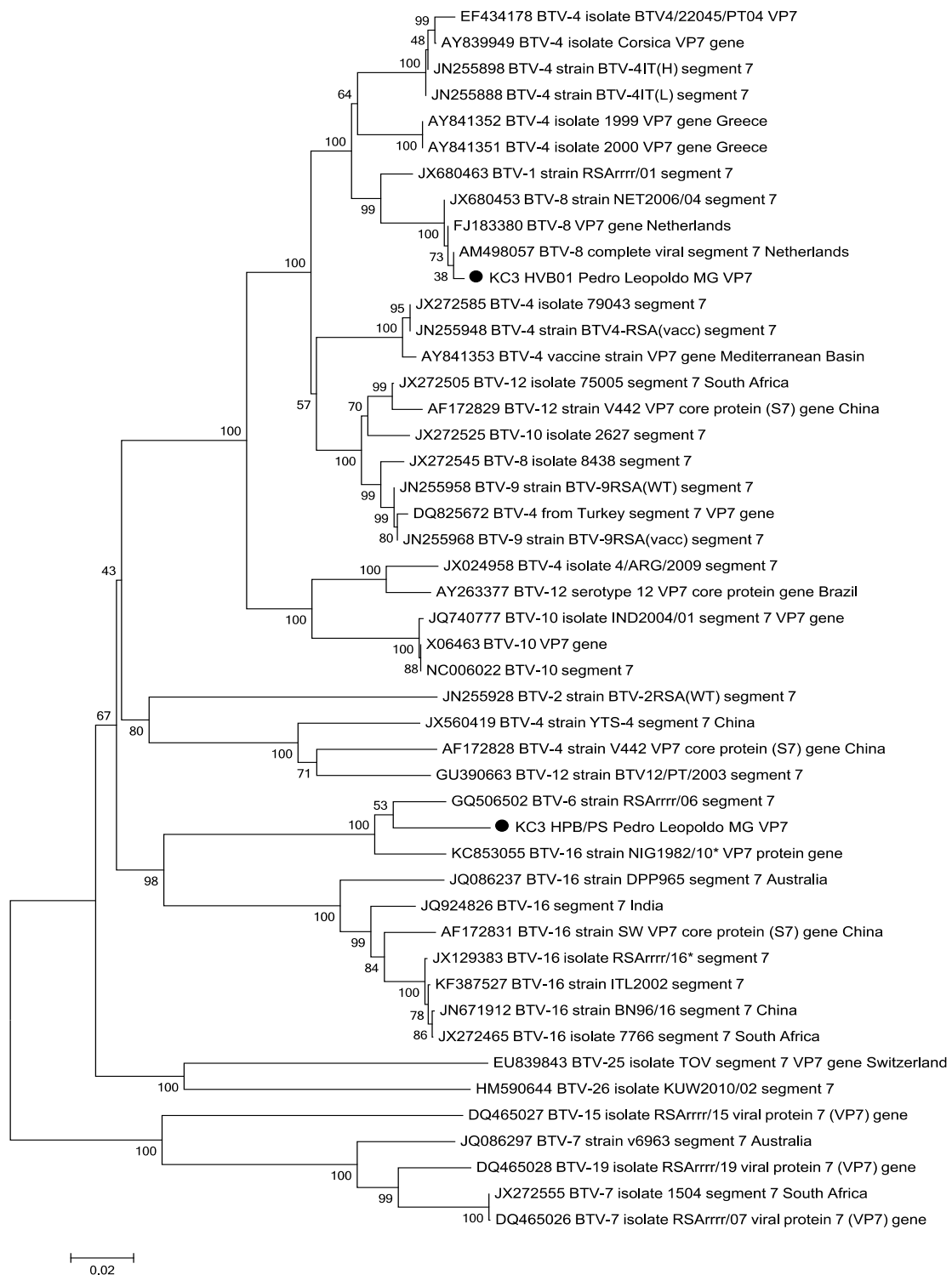
O isolado HPB/PS foi também positivo, na qRT-PCR, para BTV-16 seg-2; foi realizada a RT-PCR para a amplificação utilizando três pares de iniciadores (par de iniciadores 1 [1557 pb], par de iniciadores 2 [1498 pb], e par de iniciadores 3 [434 pb]). Como se pode observar na figura 3.12, somente houve amplificação utilizando o par de iniciadores número 3, que possui o menor

comprimento entre os pares de iniciadores, e também apresentou bandas inespecíficas. Foi realizado a purificação do cDNA (3.5.2.2) e o sequenciamento, porém, a qualidade das sequências não foi suficiente para realização de análise filogenética.

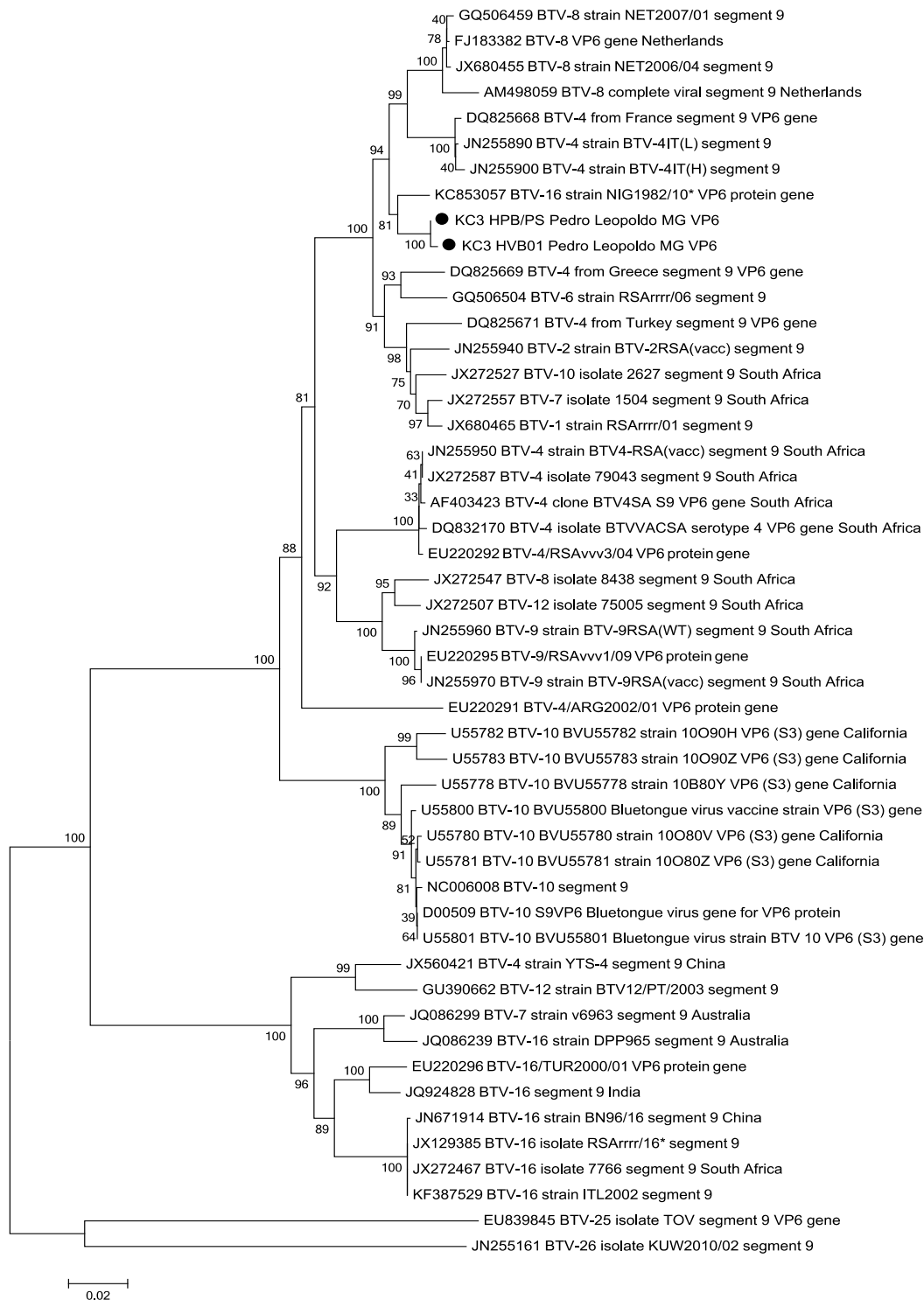


**Figura 3.12: RT-PCR para amplificação do BTV-16 seg-2.** Gel de agarose 1% (Invitrogen), corado com brometo de etídio (Promega), visualizado e fotografado em Gel Doc™ XR+ with Image Lab™ Software (Biorad). Canaleta 1: padrão de tamanho molecular 1Kb *plus* (Invitrogen); Canaleta 2: controle negativo da reação; Canaletas 3-5: isolado KC3HPB/PS com par de iniciadores 1 (1557 pb), par de iniciadores 2 (1498 pb), par de iniciadores 3 (434 pb), respectivamente; Canaleta 6: controle positivo da reação utilizando par de iniciador de número 3.

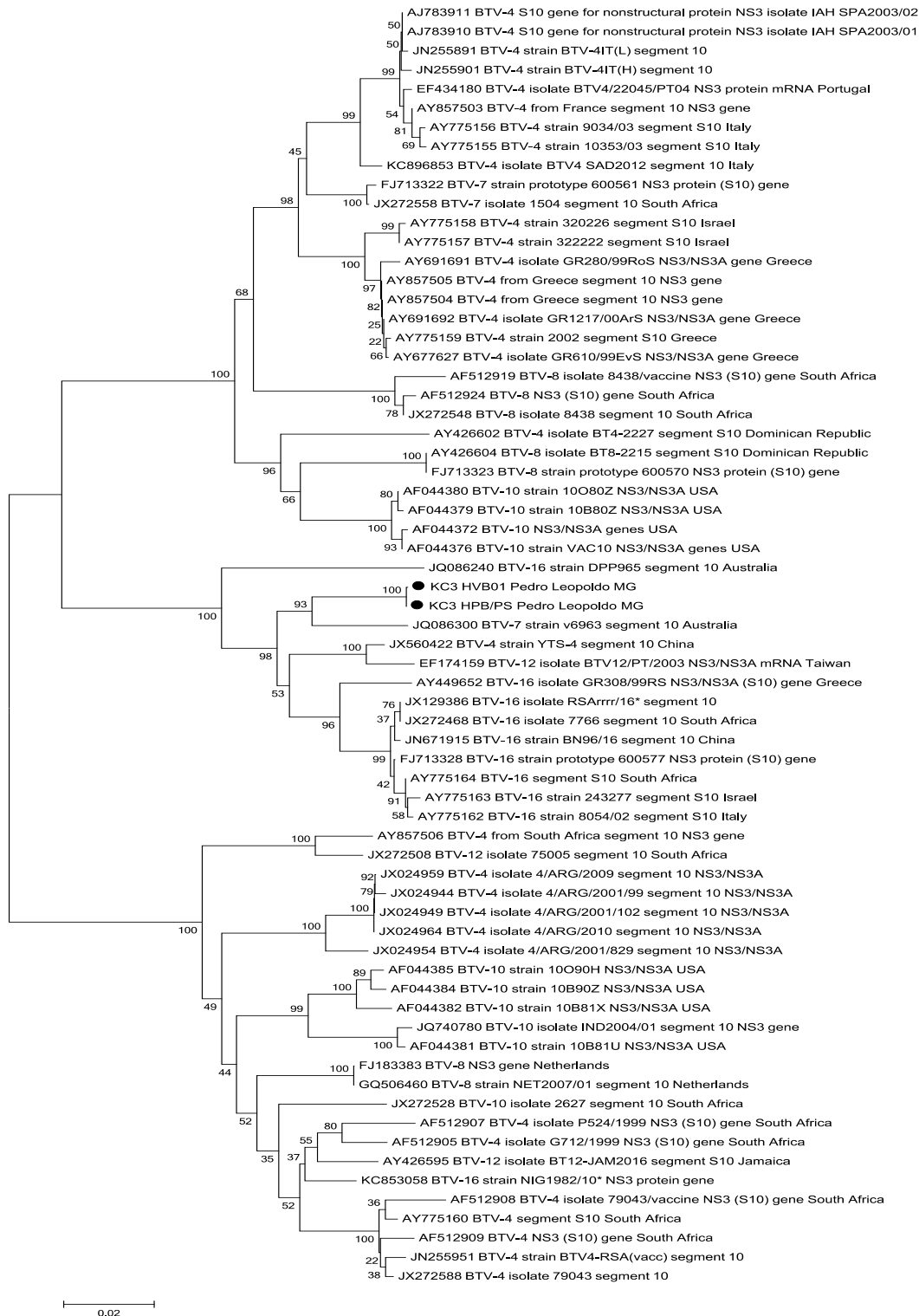
As figuras 3.13, 3.14 e 3.15 apontam a análise filogenética do seg-7, seg-9 e seg-10, respectivamente. A Figura 3.16 mostra a inferência filogenética do BTV-4 realizada a partir do seg-2, tanto para amostra de sêmen quanto para o seu respectivo isolado.



**Figura 3.13: Análise filogenética do seg-7 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01.** Árvore de *Neighbor-Joining* das sequências codificadoras da região NS3. A árvore foi feita utilizando-se a distância p com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA 5. O círculo preto representa os isolados em células KC (passagem 3).

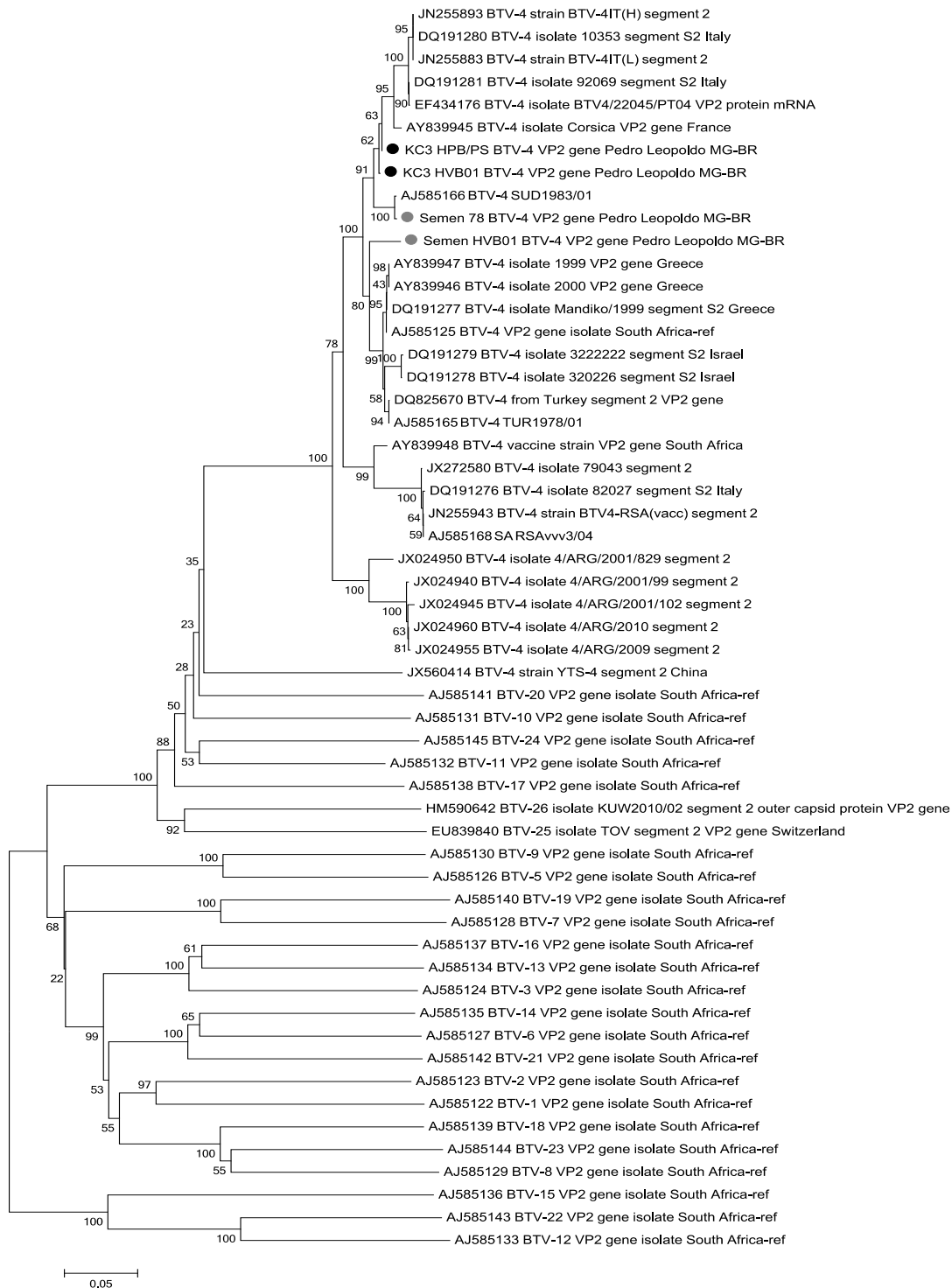


**Figura 3.14: Análise filogenética do seg-9 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01.** Árvore de *Neighbor-Joining* das sequências codificadoras da região NS3. A árvore foi feita utilizando-se a distância *p* com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA 5. O círculo preto representa os isolados em células KC (passagem 3).



**Figura 3.15:** Análise filogenética do seg-10 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01. Árvore de *Neighbor-Joining* das sequências codificadoras da região NS3. A árvore foi feita utilizando-se a distância p com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA 5. O círculo preto representa isolados em células KC (passagem 3).





**Figura 3.16:** Análise filogenética do seg-2 de BTV dos isolados de sêmen HPB/PS e HVB01 e das amostras de sêmen 78 e HVB01. Árvore de *Neighbor-Joining* das sequências codificadoras da região NS3. A árvore foi feita utilizando-se a distância p com 1000 réplicas de *bootstrap*, utilizando o programa MEGA 5. O círculo preto representa isolados em células KC (passagem 3) e o círculo cinza sequências geradas por ampliações realizadas diretamente a partir de amostras seminais.

Foi possível realizar o sequenciamento dos seg-7, 9 e 10. O sequenciamento do seg-8 foi realizado, porém com baixa qualidade e por isso não foi feita a análise filogenética. O genoma do BTV é segmentado, possuindo 10 genes, nomeados como segmentos de 1 a 10. Dentre estes, e, segundo as metodologias abordadas neste trabalho, somente o segmento 2 (codificador da VP2) permite a tipagem exata das amostras. Por essa razão, somente com a análise filogenética do seg-7, seg-9 e seg-10, não foi possível realizar uma inferência filogenética mais precisa. De acordo com a sequência do seg-7, a amostra HVB01 ficou próxima de amostras do BTV-8, previamente depositadas no *GenBank*, e a amostra HPB/PS próxima do BTV-6. Já para o seg-9 ambas as amostras ficaram próximas do BTV-16 e seg-10 próxima do BTV-7.

O sequenciamento do BTV-16 seg-2 também foram realizados para a amostra do HPB/PS, porém, mostrou baixa qualidade, não sendo possível realizar as inferências filogenéticas. O sequenciamento do seg-2 para o BTV-4 foi realizado para os isolados (HPB/PS e HVB01) e amostras de sêmen (78 e HVB01). Todas as amostras ficaram próximas aos isolados da Europa, Itália, Portugal e França. Destaca-se que o Brasil importou muitos animais desses países no passado, assim como ocorreu importação dos EUA e Índia.

Dos países europeus, houve importação da França, Itália, Suíça, Portugal, Holanda e Reino Unido. As principais raças bovinas importadas da Itália foram a Marchigiana e Piemontês. A Marchigiana começou a ser importada em 1960 e em vinte anos o Brasil possuía o maior rebanho desta raça fora da Itália. Já o Piemontês foi introduzido no Brasil em 1974, e desde 1994, a raça cresceu 175%. As principais raças francesas introduzidas do Brasil foram a Charolês, em 1922 e o Limousin, com primeiro registro em 1872. Depois disso houve outras importações. Outro fato importante foi a importação de grande número de animais ocorrida em 1916 para o melhoramento genético da raça Caracu (<http://www.sic.org.br>- Serviço de Informação da Carne).

Este trabalho aqui apresentado é pioneiro e pode contribuir com informações muito importantes para os programas de controle a serem desenvolvidos pelas autoridades sanitárias do MAPA, Novos trabalhos com informações filogenéticas sobre as amostras circulantes favorecerão análises epidemiológicas mais acuradas.

## 6 Referencias Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA, 2012).[HTTP://WWW.ASBIA.ORG.BR/NOVO/UPLOAD/MERCADO/INDEX2012.PDF](http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2012.pdf)

ARGOV-ARGAMAN, N.; MAHGREFTHE, K.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Variation In Lipid Profiles Within Semen Compartments: The Bovine Model Of Aging. *Theriogenology*, v.80, n.7, p.712-721, 2013.

CLAVIJO, A.; SEPULVEDA, L.; RIVA, J.; PESSOA SILVA, M.; TAILOR RUTHES, A.; LOPEZ, J.W. Isolation of bluetongue virus serotype 12 from an outbreak of the disease in South America. *Vet Rec.*, v.151, n.10, p.301-2, 2002.

CUNHA, R.G.; DE SOUZA, D.M; DA SILVA PASSOS, W. Antibodies to bluetongue virus in sera from cattle of Sao Paulo's state and Brazil's south region. *Rev. Bras. Med.Vet.*, v.9, p.121-4, 1987.

FIGLIORE, JR.; LA GRASTA, L.; DI STEFANO, M.; BUCCOLIERO, G.; PASTORE, G.; ANGARANO, G. The use of serum-free medium delays, but does not prevent, the cytotoxic effects of seminal plasma in lymphocyte cultures: implications for studies on HIV infection. *New Microbiol.*, v.20, n.4, p.339-344, 1997.

GROOCCOCK, C. M.; CAMPBELL, C. H. Isolation of an exotic serotype bluetongue virus from imported cattle in quarantine. *Can J Comp Med.*, v. 46, n.2, p.160-4, 1982.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*,v.41, p.95-98, 1999.

LEGISA, D. M.; GONZALEZ, F. N.; DUS SANTOS, M. J. Bluetongue virus in South America, Central America and the Caribbean. *Virus Research*, article in press, 2013.

ORRÙ, G.; FERRANDO, M. L.; MELONI, M.; LICCARDI, M.; SAVINI, G.; DE SANTIS, P. Rapid detection and quantitation of bluetongue virus (BTV) using a molecular beacon fluorescent probe assay. *J Virol Methods*, v.137, p.34-42, 2006.

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética: um guia prático. Bragança, Pará: Grafipel, p.115, 2003.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON,N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v.28, p.2731-2739, 2011.

TAUTZ, D; RENZ, M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.*, v.132. n.1, p.14-19, 1983.

## CONCLUSÕES

Os ensaios desenvolvidos foram sensíveis e específicos. Não houve grande diferença na sensibilidade dos testes para ambos os vírus testados na comparação entre a RT-PCR e a qRT-PCR *one-step*, tanto para BVDV quanto para BTV. Este achado pode ser vantajoso, uma vez que na testagem de grande número de amostras, a RT-PCR possui um preço mais acessível que o da qRT-PCR cinética. Destaca-se ainda que nem todos os laboratórios estão preparados para colocar a PCR em tempo real em rotina, devido aos altos custos de aparelho e reagentes, além da necessidade de pessoal treinado.

Os testes diagnósticos desenvolvidos e otimizados nesse trabalho, foram utilizados para testar 53 amostras de sêmen coletadas em quatro diferentes municípios do Estado de Minas Gerais - Carlos Chagas, Pedro Leopoldo, Coronel Pacheco e Ituiutaba - que representam as mesorregiões Mucuri, Metropolitana de Belo Horizonte, Zona da Mata e Triângulo Mineiro, respectivamente. Encontraram-se amostras de sêmen positivas tanto para BTV quanto para BVDV em todas as regiões avaliadas. Mais de um quarto das amostras de sêmen continha BTV e BVDV em coinfeção. Estes dados são de grande relevância biológica, uma vez que Minas Gerais é o segundo estado em produção bovina do país, e este resultado pode ser extrapolado para outras regiões brasileiras.

O sequenciamento das amostras de BVDV revelou nas amostras testadas somente BVDV-1. O sequenciamento viral direto de amostra de sêmen e também a partir de isolamento viral em células de insetos comprovou a presença do BTV-4 em nosso país (sequência codificadora do segmento 2). As inferências filogenéticas mostraram ainda que o BTV-4 apresentou maior similaridade com amostras europeias em comparação com amostras da América do Sul.

A qRT-PCR para o segmento 2 desenvolvida no Instituto Pirbright para a tipagem direta de amostras de BTV mostrou de maneira inédita a circulação de BTV-8, BTV-10 e BTV-16 no Brasil. Comprovou-se ainda o isolamento de quatro distintos tipos de BTV em uma única amostra seminal (BTV-4, BTV-8, BTV-10 e BTV-16) e em outra amostra, de dois sorotipos (BTV-4 e BTV-10). Este achado é de considerável relevância para a geração de medidas de controle desta virose no país, uma vez que existe até hoje somente a descrição de dois tipos isolados de amostras brasileiras (BTV-4 e BTV-12). As amostras que continham diferentes tipos de BTV estavam também infectadas com BVDV-1, comprovando a necessidade de se testar cada partida seminal produzida, e, o risco sanitário representado por uma única amostra não testada para um rebanho.

## ANEXOS

**Anexo 1 Tabela com as amostras de sêmen e resultados da RT-PCR e qRT-PCR para BTV**

Número da amostra	Cidade-MG	RT-PCR <i>one-step</i> seg-10	qRT-PCR <i>one-step</i> BR seg-10	Sequenciamento BR seg-10	qRT-PCR <i>one-step</i> UK seg-10	qRT-PCR <i>one-step</i> UK BTV-4 seg-2
128	Carlos Chagas	Negativo	36.31	NA	<b>33.65</b>	39.03
444	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>21.50</b>	OK	<b>30.4</b>	<b>31.16</b>
607	Carlos Chagas	Negativo	<b>35.88</b>	NA	<b>33.95</b>	Sem Ct.
821	Carlos Chagas	Negativo	<b>32.71</b>	NA	<b>31.49</b>	<b>34.7</b>
845	Carlos Chagas	Negativo	36.27	NA	36.36	41.71
863	Carlos Chagas	Negativo	<b>32.89</b>	NA	<b>34.88</b>	Sem Ct.
872	Carlos Chagas	Negativo	36.61	NA	Sem Ct.	Sem Ct.
886	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>35.59</b>	OK	Sem Ct.	Sem Ct.
896	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>35.64</b>	OK	38.05	Sem Ct.
901	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>35.03</b>	OK	37.11	<b>36.21</b>
905	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>34.23</b>	OK	41.26	Sem Ct.
906	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>34.96</b>	NA	40.10	Sem Ct.
917	Carlos Chagas	Negativo	36.53	NA	37.17	Sem Ct.
927	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>35.70</b>	OK	36.14	38.15
929	Carlos Chagas	Negativo	<b>34.12</b>	NA	<b>33.52</b>	37.4
930	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA	Sem Ct.	Sem Ct.
936	Carlos Chagas	Negativo	37.89	NA	38.39	Sem Ct.
939	Carlos Chagas	Negativo	37.66	NA	37.00	42.25
940	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>31.13</b>	OK	<b>34.60</b>	37.1
941	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>35.59</b>	OK	Sem Ct.	Sem Ct.
945	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>33.69</b>	OK	37.64	Sem Ct.
946	Carlos Chagas	Negativo	37.20	NA	39.70	Sem Ct.
947	Carlos Chagas	Negativo	<b>33.92</b>	NA	<b>35.76</b>	41.89
949	Carlos Chagas	Negativo	37.14	NA	37.43	37.12
950	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>33.63</b>	NA	NA	NA
951	Carlos Chagas	Negativo	37.46	NA	39.66	Sem Ct.
957	Carlos Chagas	Negativo	<b>35.18</b>	NA	<b>35.74</b>	44.86
958	Carlos Chagas	Negativo	36.74	NA	<b>34.68</b>	41.09
960	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>35.40</b>	OK	40.45	Sem Ct.
964	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>21.44</b>	OK	<b>35.03</b>	41.96
966	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	Sem Ct.	OK	44.22	Sem Ct.
968	Carlos Chagas	Negativo	36.02	NA	<b>35.54</b>	37.2
970	Carlos Chagas	Negativo	<b>35.88</b>	NA	39.02	Sem Ct.

1007	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>33.67</b>	OK	Sem Ct.	Sem Ct.
1	Pedro Leop.	Negativo	<b>33.43</b>	NA	36.72	Sem Ct.
21	Pedro Leop.	Negativo	38.50	NA	38.37	Sem Ct.
23	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>29.26</b>	OK	36.81	<b>35.9</b>
45	Pedro Leop.	Negativo	<b>32.31</b>	NA	NA	NA
78	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>22.99</b>	OK	<b>24.72</b>	<b>28.32</b>
92	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>25.99</b>	NA	<b>35.55</b>	44.49
HPB PS	Pedro Leop.	Negativo	<b>31.77</b>	NA	<b>29.59</b>	<b>32.97</b>
HVB 01	Pedro Leop.	Negativo	<b>30.58</b>	NA	<b>29.42</b>	<b>27.77</b>
s/ brinco	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>25.92</b>	OK	<b>33.04</b>	37.89
105	Coronel Pacheco	Negativo	Sem Ct.	NA	Sem Ct.	Sem Ct.
224	Coronel Pacheco	Negativo	36.67	NA	40.4	47.7
229	Coronel Pacheco	<b>Positivo</b>	<b>23.22</b>	OK	<b>35.94</b>	<b>36.18</b>
405	Coronel Pacheco	<b>Positivo</b>	<b>26.98</b>	NA	<b>27.88</b>	<b>31.06</b>
1	Ituiutaba	<b>Positivo</b>	36.71	NA	37.52	Sem Ct.
2	Ituiutaba	<b>Positivo</b>	<b>29.53</b>	NA	36.77	Sem Ct.
3	Ituiutaba	Negativo	Sem Ct.	NA	NA	NA
4	Ituiutaba	<b>Positivo</b>	37.38	NA	Sem Ct.	Sem Ct.
5	Ituiutaba	Negativo	Sem Ct.	NA	Sem Ct.	Sem Ct.
6	Ituiutaba	Negativo	Sem Ct.	NA	Sem Ct.	Sem Ct.

NA- Não analisado

**Anexo 2 Tabela com as amostras de sêmen e resultados da RT-PCR e qRT-PCR para BVDV**

Número da amostra	Cidade-MG	RT-PCR <i>one-step</i> 5'UTR	qRT-PCR <i>one-step</i> 5'UTR	Sequenciamento 5'UTR
128	Carlos Chagas	Negativo	<b>33.96</b>	NA
444	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>27.18</b>	OK
607	Carlos Chagas	Negativo	<b>35.25</b>	NA
821	Carlos Chagas	Negativo	39.34	NA
845	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>30.56</b>	OK
863	Carlos Chagas	Negativo	37.52	NA
872	Carlos Chagas	Negativo	<b>33.76</b>	NA
886	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
896	Carlos Chagas	Negativo	38.37	NA
901	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>32.45</b>	NA
905	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
906	Carlos Chagas	Negativo	<b>34.93</b>	NA
917	Carlos Chagas	Negativo	37.75	NA
927	Carlos Chagas	Negativo	38.49	NA
929	Carlos Chagas	Negativo	36.67	NA
930	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>34.19</b>	NA
936	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
939	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
940	Carlos Chagas	Negativo	37.34	NA
941	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>32.75</b>	NA
945	Carlos Chagas	Negativo	36.59	NA
946	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
947	Carlos Chagas	Negativo	39.17	NA
949	Carlos Chagas	Negativo	37.74	NA
950	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>29.43</b>	NA
951	Carlos Chagas	Negativo	36.79	NA
957	Carlos Chagas	Negativo	<b>35.12</b>	NA
958	Carlos Chagas	Negativo	37.50	NA
960	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
964	Carlos Chagas	Negativo	37.39	NA
966	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>33.68</b>	NA
968	Carlos Chagas	Negativo	Sem Ct.	NA
970	Carlos Chagas	Negativo	38.38	NA
1007	Carlos Chagas	<b>Positivo</b>	<b>33.78</b>	OK
1	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>32.56</b>	OK
21	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>29.67</b>	OK

23	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>30.75</b>	OK
45	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>27.95</b>	OK
78	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>29.91</b>	OK
92	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>31.17</b>	OK
HPB PS	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>30.25</b>	NA
HVB 01	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>31.89</b>	OK
s/ brinco	Pedro Leop.	<b>Positivo</b>	<b>32.67</b>	OK
105	Coronel Pacheco	Negativo	38.54	NA
224	Coronel Pacheco	<b>Positivo</b>	<b>31.78</b>	OK
229	Coronel Pacheco	<b>Positivo</b>	<b>29.62</b>	OK
405	Coronel Pacheco	<b>Positivo</b>	<b>32.45</b>	OK
1	Ituiutaba	Negativo	<b>34.64</b>	NA
2	Ituiutaba	<b>Positivo</b>	<b>30.35</b>	OK
3	Ituiutaba	Negativo	37.81	NA
4	Ituiutaba	<b>Positivo</b>	<b>30.98</b>	OK
5	Ituiutaba	Negativo	38.27	NA
6	Ituiutaba	Negativo	Sem Ct.	NA

NA-Não analisado

### Anexo 3 Tabela resultados sensibilidade analítica BVDV e BTV

	<b>BVDV</b>			
	<b>RT-PCR</b>		<b>qRT-PCR</b>	
	<i>One-step</i>	<i>Two-step</i>	<i>One-step</i>	<i>Two-step</i>
CC	$1.6 \times 10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$1.6 \times 10^{-4}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$1.6 \times 10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$1.6 \times 10^{-4}$ TCID <sub>50</sub> /50µL
SEC	$1.6 \times 10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$1.6 \times 10^{-3}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$1.6 \times 10^0$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$1.6 \times 10^{-3}$ TCID <sub>50</sub> /50µL
	<b>BTV</b>			
	<b>RT-PCR</b>		<b>qRT-PCR</b>	
	<i>One-step</i>	<i>Two-step</i>	<i>One-step</i>	<i>Two-step</i>
CC	$6.3 \times 10^{-2}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$6.3 \times 10^{-4}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$6.3 \times 10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$6.3 \times 10^{-4}$ TCID <sub>50</sub> /50µL
SEC	$6.3 \times 10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$6.3 \times 10^{-2}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$6.3 \times 10^{-1}$ TCID <sub>50</sub> /50µL	$6.3 \times 10^{-4}$ TCID <sub>50</sub> /50µL

CC- cultivo celular

SEC- sêmen experimentalmente contaminado



**Anexo 4 Documento do envio de amostras seminais para UK**



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**  
**SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA**  
**DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL**

**REQUERIMENTO PARA EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS, MATERIAL DE MULTIPLICAÇÃO ANIMAL, MICRO-ORGANISMOS, PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL OU MATERIAL BIOLÓGICO DE ORIGEM ANIMAL NÃO DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO HUMANA OU ANIMAL**

Ao:

Senhor Chefe do Serviço de Sanidade Agropecuária – SSA / SFA / MG, em

Belo Horizonte, M.G.  
(Unidade da Federação)

Solicito autorização para exportação da mercadoria caracterizada neste requerimento, tendo em vista o Decreto nº 24.548, de 03 de julho de 1934, e o Decreto N° 5741 de 30 de março de 2006, e para o referido fim presto as informações que se seguem:

**1. IDENTIFICAÇÃO DA MERCADORIA**

1.1 ( ) Animal Vivo (especificar espécie, raça/linhagem, sexo) *ler item 1.1 para preenchimento* **OU**

1.2 ( ) Material de Multiplicação Animal (especificar o material, espécie, raça/linhagem) *ler item 1.2 para preenchimento* **OU**

1.3 (x) Produto de Origem Animal ou Material Biológico de Origem Animal não destinado ao consumo humano ou animal (especificar espécie de origem, forma de obtenção, processamento e forma de preservação) *ler item 1.3 para preenchimento* **OU**

1.4 ( ) Micro-organismo ou outro agente de interesse veterinário (*ler item 1.4 para preenchimento*):

**DESCRIÇÃO**

1.1.1 – sangue total de bovinos, coletado por venopunção em tubos contendo EDTA, centrifugados para a obtenção de papa de hemáceas e estocados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até o envio ( a ser realizado em gelo seco).

1.1.6 –sêmen de bovino coletado com o auxílio de eletroejaculador, porém, destacado aqui como 1.1.6 (demais produtos de origem animal ou materiais biológicos de origem animal não destinados à alimentação humana ou animal) uma vez que não foi realizado o processo de crio-preservação e o sêmen NÃO se destina a ser utilizado como material de multiplicação animal, e sim como fonte de DNA para pesquisa científica e tecnológica.

A mercadoria relacionada neste requerimento é geneticamente modificada ou obtida a partir de animais geneticamente modificados? ( ) Sim ( x ) Não

1.5 Quantidade (*ler item 1.5 para preenchimento*): serão enviados 20 amostras de sangue (papa de hemácea) e 53 amostras de sêmen (não sendo criopreservadas para multiplicação animal não se tratam de doses).

1.6 Finalidade (*ler item 1.6 para preenchimento*):

1.6.10 - pesquisa científica e tecnológica,

2. **EXPORTADOR** (ler item 2 para preenchimento):

NOME OU RAZÃO SOCIAL: **Instituto de Ciências Biológicas -Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG).**

CGC/CNPJ: 17217985-0001-04

ENDEREÇO: Avenida Antônio Carlos nº 6627, Bairro São Francisco. CEP – 30.270-901.

CIDADE/ESTADO/ PAÍS: Belo Horizonte - Minas Gerais, Brasil

TELEFONE/FAX: 31 3409-2753 / 31 4409-2733

EMAIL: [edelfb@icb.ufmg.br](mailto:edelfb@icb.ufmg.br) (Responsável: Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli – Médica Veterinária CRMV-7 3356; Professora Associada do ICB)

3. **ESTABELECIMENTO DE ORIGEM/PRODUÇÃO** (ler item 3 para preenchimento):

NOME OU RAZÃO SOCIAL: A mesma do item 2.

CGC/CNPJ:

ENDEREÇO:

CIDADE/ESTADO:

TELEFONE/FAX:

EMAIL:

REGISTRO NO MAPA (Se couber)

4. **ESTABELECIMENTO DE PROCEDÊNCIA/ARMAZENAMENTO** (Se couber, ler item 4 para preenchimento):

NOME OU RAZÃO SOCIAL:

CGC/CNPJ:

ENDEREÇO:

CIDADE/ESTADO:

TELEFONE/FAX:

REGISTRO NO MAPA (Se couber)

5. **IMPORTADOR** (ler item 5 para preenchimento):

NOME OU RAZÃO SOCIAL: Professor John Fazakerley. The Pirbright Institute, Pirbright Laboratory,

ENDEREÇO: Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, UK.

CIDADE/ESTADO/PAÍS: Pirbright / Surrey / United Kingdom

TELEFONE/FAX: | Tel: +44 (0)1483 232441

EMAIL: [enquiries@pirbright.ac.uk](mailto:enquiries@pirbright.ac.uk)

6. **ESTABELECIMENTO DE DESTINO** (ler item 6 para preenchimento):

NOME OU RAZÃO SOCIAL: The Pirbright Institute, Pirbright Laboratory, Non vesicular reference laboratories

CGC/CNPJ:

ENDEREÇO: Ash Road, Pirbright, Surrey, GU24 0NF, UK.

CIDADE/ESTADO: Pirbright / Surrey / United Kingdom  
TELEFONE/FAX: +44 (0)1483 232441/231148 / +44 (0) 1483 235745/232621  
EMAIL: [peter.mertens@pirbright.ac.uk](mailto:peter.mertens@pirbright.ac.uk)

7. **TRANSPORTE**(*ler item 7 para preenchimento*):

MEIO DE TRANSPORTE: Aérea  
EMPRESA AÉREA - Nº DO VOO / NOME DO NAVIO /  
PLACA DO VEÍCULO RODOVIÁRIO  
DATA PROVÁVEL DE EMBARQUE  
UNIDADE/SERVIÇO DE VIGILÂNCIA AGROPECUÁRIA  
INTERNACIONAL DE EGRESSODO BRASIL  
PAÍS DE DESTINO: **United Kingdom**  
LOCAL DE DESEMBARQUE NO PAÍS DE DESTINO  
PAÍS DE TRÂNSITO (QUANDO HOVER):

8. **TERMO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA PELA QUARENTENA**(*Se couber, ler item 8 para preenchimento*):

EU,

**CRMV Nº**

DECLARO QUE ASSUMO A FUNÇÃO DE RESPONSÁVEL TÉCNICO PELA QUARENTENA DOS ANIMAIS ESPECIFICADOS NESTE REQUERIMENTO E RESPONSABILIZO-ME PELA TRANSMISSÃO DAS INFORMAÇÕES REFERENTES A OCORRÊNCIAS SANITÁRIAS E ÓBITOS (QUANDO HOVER), ALÉM DE FORNECER, POR MEIO DE ATESTADOS, OS RESULTADOS DE ENSAIOS LABORATORIAIS, VACINAÇÕES, TRATAMENTOS, DENTRE OUTRAS INFORMAÇÕES QUE FOREM REQUERIDAS PELO MAPA.

**Estabelecimento para Isolamento/Quarentena:**

ENDEREÇO:  
CIDADE/ESTADO:  
TELEFONE/FAX:  
EMAIL:

**ASSINATURA:**

9. **CONTATO PARA ESCLARECIMENTOS E OUTROS FINS:**(*ler item 9 para preenchimento*):

( ) O IMPORTADOR ( x ) REPRESENTANTE LEGAL ( x ) OUTRO:

NOME OU RAZÃO **Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi – Vice-Diretora do ICB - UFMG**

ENDEREÇO: **Instituto de Ciências Biológicas UFMG. Avenida Antonio Carlos, 6627. Bairro São Francisco. Caixa Postal 486. CEP 31.270-901.**

CIDADE/ESTADO: **Belo Horizonte / Minas Gerais.**

TELEFONE/FAX: **(31)3409-2501(31)3409-2525**

EMAIL: **dir@icb.ufmg.br**

( ) O IMPORTADOR ( ) REPRESENTANTE LEGAL ( x ) OUTRO:

NOME OU RAZÃO **Edel Figueiredo Barbosa Stancioli – Professora Associada – Médica Veterinária CRMV-7 3356**

ENDEREÇO: **Departamento de Microbiologia – ICB – UFMG. Avenida Antonio Carlos, 6627. Bairro São Francisco. Caixa Postal 486. CEP 31.270-901.**

CIDADE/ESTADO: **Belo Horizonte / Minas Gerais.**

TELEFONE/FAX: **31 3409-2753; 31 3409-2733**

EMAIL: **edelfb@icb.ufmg.br**

**10. DOCUMENTOS ANEXOS OU A SEREM ANEXADOS**(*ler item 10 para preenchimento*):

- a. ( ) CÓPIA DA FATURA PRÓ-FORMA IDENTIFICANDO A MERCADORIA
- b. ( ) DECLARAÇÃO DE DOAÇÃO
- c. ( ) CÓPIA DA PROCURAÇÃO PASSADA PELO IMPORTADOR
- d. ( ) LICENÇA DE EXPORTAÇÃO DO IBAMA
- e. ( ) TERMO DE FECHAMENTO DE QUARENTENA, EMITIDO POR FISCAL FEDERAL AGROPECUÁRIO
- f. ( ) RESULTADOS DE ENSAIOS LABORATORIAIS, VACINAÇÕES E TRATAMENTOS, CONFORME SOLICITAÇÃO DO PAÍS IMPORTADOR
- g. ( ) AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO EMITIDA PELO PAÍS IMPORTADOR
- h. ( ) ATESTADO EMITIDO POR MÉDICO VETERINÁRIO QUE PERMITA CERTIFICAR AS EXIGÊNCIAS DO PAÍS IMPORTADOR
- i. (x) DECLARAÇÃO EMITIDA PELO INTERESSADO QUE PERMITA CERTIFICAR AS EXIGÊNCIAS DO PAÍS IMPORTADOR
- j. COMPROVAÇÃO DE CADASTRO DE PESSOA FÍSICA OU JURÍDICA
- k. ( ) OUTROS: ESPECIFICAR

Belo Horizonte, 08 de janeiro de 2013

---

Profa. Dra. Janetti Nogueira de Francischi  
Vice-Diretora do ICB - UFMG

---

Edel Figueiredo Barbosa Stancioli – CRMV-7 número 3356  
Professora Associada – Departamento de Microbiologia – ICB – UFMG  
Laboratório de Virologia Básica e Aplicada

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO REQUERIMENTO PARA EXPORTAÇÃO DE ANIMAIS VIVOS, MATERIAL DE MULTIPLICAÇÃO ANIMAL, MICRO-ORGANISMOS, PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL OU MATERIAL BIOLÓGICO DE ORIGEM ANIMAL NÃO DESTINADOS À ALIMENTAÇÃO HUMANA OU ANIMAL

**Anexo 5 Documento de notificação da positividade de BTV em amostras de sêmen**



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Microbiologia**  
Av. Antônio Carlos , 6627  
31270-901 Belo Horizonte - MG – Brasil  
Fone: (031) 3409- 2731  
Fax: (031) 3409- 2730



Ilmo. Sr.  
Dr. Demerval Silva Neto  
D.D. Chefe da Divisão de Defesa Agropecuária – DDA/SFA-MG

SFA/MINAS GERAIS  
Superintendente Federal  
Geraldo Emídio Júnior  
Endereço: Av. Raja Gabaglia, 245, Cidade Jardim-30380 090 - Belo Horizonte/MG  
Fone: (31) 3250 0306/3250 0300  
Fax: (31) 3250 0314  
E-mail: [gab-mg@agricultura.gov.br](mailto:gab-mg@agricultura.gov.br)

Belo Horizonte, 06 de novembro de 2012.

Prezado senhor,

Sou Professora Associada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas do ICB, UFMG, e, também Médica Veterinária (CRMV-MG 3356). Oriento o doutoramento de Marcela Ribeiro Gasparini (também Médica Veterinária – CRMV-MG 11538) no desenvolvimento de sua tese: Desenvolvimento e padronização de um *procedimento operacional padrão* para avaliação do sêmen bovino para os seguintes vírus: BVDV, BTV e Herpesvirus bovino (BoHV-1.1, BoHV-1.2 e BoHV-5) utilizando PCR convencional e PCR cinética. Ressalto que este projeto foi financiado pelo MAPA/CNPq no Edital 64/2008, edital que trabalhou nas demandas induzidas do Ministério.

É meu dever comunicá-lo que amostras frescas de sêmen de bovinos ASSINTOMÁTICOS foram positivas para *Blue tongue virus* – BTV utilizando a metodologia de PCR. As amostras foram coletadas nas seguintes áreas geográficas: Vale do Jequitinhonha (19 amostras positivas/34 amostras testadas); Região Metropolitana de Belo Horizonte (6 amostras positivas / 9 amostras testadas); Zona da Mata (3 amostras positivas / 4 amostras testadas) e Triângulo Mineiro (4 amostras / 6 amostras testadas). Atesto que estes dados não foram ainda publicados, aguardando esta comunicação.

Atenciosamente,  
Edel Figueiredo Barbosa Stancioli  
Professora Associada  
Departamento de Microbiologia  
ICB - UFMG