



**PADRONIZAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR E PCR EM TEMPO REAL PARA  
DETECÇÃO DO VÍRUS DA MAMILITE HERPÉTICA BOVINA**

LARISSA TUFFANI DE PAULA

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, na Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Animal, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio

Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

**São Paulo**

**2017**

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Agência Paulista de  
Tecnologia dos Agronegócios Instituto Biológico Programa de Pós-Graduação em  
Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio**

**PADRONIZAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR E PCR EM TEMPO REAL PARA  
DETECÇÃO DO VÍRUS DA MAMILITE HERPÉTICA BOVINA**

**Larissa Tuffani de Paula**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio. Área de concentração:  
Segurança Alimentar e Sanidade no  
Agroecossistema

**São Paulo**

**2017**

Larissa Tuffani de Paula

**PADRONIZAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR E PCR EM TEMPO REAL PARA  
DETECÇÃO DO VÍRUS DA MAMILITE HERPÉTICA BOVINA**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de  
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e  
Sanidade no Agroecossistema

Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

**São Paulo**

**2017**

Eu, Larissa Tuffani de Paula, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Tuffani de Paula, Larissa.  
Padronização da Semi-Nested PCR e PCR em tempo real para detecção e quantificação do vírus da Mamilite Herpética Bovina. / Larissa Tuffani de Paula.  
– São Paulo, 2017.  
53 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.  
Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na produção animal.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.  
Versão do título para o inglês: Standardization of Semi-Nested PCR and real-time PCR for the detection and quantification of bovine Herpetic Mamilite virus.

1. BoHV-2 2. Doenças vesiculares 3. qPCR 4. snPCR. I. Tuffani de Paula, Larissa II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

*IB/Bibl./2017/002*

---

**FOLHA DE APROVAÇÃO****Nome: Larissa Tuffani de Paula****Título: PADRONIZAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR E PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA MAMILITE HERPÉTICA BOVINA****Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.**

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora**

Profª Drª: Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profª Drª: Claudia Del Fava

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profª Drª: André Rinaldi Fukushima

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação as mulheres especiais da minha vida, que me ensinaram a ser forte e lutar para realizar meus sonhos, sem nunca desistir. As mesmas mulheres que me ensinaram o significado de família e de guerreira, e que sem as quais eu não saberia hoje caminhar com minhas próprias pernas. Vó, Mãe, Tia e Lu. Obrigada por me fazerem crescer. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** e as **Falanges** por me guiarem nos caminhos certos, me mostrando que todos os desafios depositados à nossa frente servem para serem superados nos tornando mais aptos para os próximos.

À Minha **Tia/Mãe Gladis**, que me apoiou e me apoia nas minhas decisões, que está ao meu lado me dando todo o suporte necessário, que me encoraja sempre a seguir em frente e me ajuda com qualquer problema que eu possa ter. Por ser a pessoa que eu tenho certeza que estará sempre ao meu lado.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Edviges Maristela Pituco**, por me aceitar como orientada e me acolher no laboratório. Pela oportunidade e confiança. Pela colaboração e ajuda na realização desse trabalho. Por todo o suporte dado.

Ao Prof. Dr. **André Rinaldi Fukushima**, departamento de Patologia Animal da Universidade de São Paulo, membro da banca examinadora, pelas sugestões dadas e correções. Pela paciência e disponibilidade. Por me ensinar e me ajudar a crescer.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Cláudia Del Fava**, pesquisadora do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico, membro da banca examinadora, pelas sugestões de correção, pela ajuda no desenvolvimento da dissertação, e por toda a ajuda fornecida.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Harakava**, Pró-reitor de Ensino e Pesquisa do Programa de Pós-Graduação do Instituto Biológico e pesquisador na área de fitopatologia, membro suplente da banca, por todo o suporte, apoio e ajuda fornecida.

Ao Prof. Dr. **Fábio Gregori**, departamento de medicina veterinária preventiva da Universidade de São Paulo, membro suplente da banca.

Às minhas amigas e parceiras de pesquisa **Adeline, Michele, Thais, Vivian** e especialmente **Maira**, por me ajudar e ensinar durante todo o projeto. Pelas risadas e cafés. Pela força e apoio. Por estarem ao meu lado, mesmo tendo obrigações a cumprir, oferecendo não só palavras, mas tempo e dedicação afim de auxiliar e colaborar. Meninas maravilhosas que levarei por toda a minha vida.

Aos meus amigos e amigas que deram força durante todo o processo, que estavam comigo em pensamentos, ou pessoalmente, que me faziam parar e respirar para conseguir continuar. Pelos melhores conselhos, por me ouvirem e estarem me amparando e desejando força e sorte. Por me ajudarem nessa conquista.

Ao meu namorado **Douglas** por me apoiar nessa realização, lendo e sugerindo ideias quando as palavras não vinham, dividindo o tempo que tínhamos juntos, tendo paciência e dando o suporte que eu precisava para conseguir continuar sempre.

À pesquisadora **Liria Hiromi Okuda**, pela ajuda, suporte, paciência, ensinamentos e por contribuir no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do LVB, **Alisete, Claudia, Adriana, Regina, Thaís, Raquel, Antera, e Marta** pela convivência diária, onde indiretamente contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho e pela disponibilidade quando precisei de ajuda.

Ao **Instituto Biológico e Pós-Graduação**, funcionários, professores e colegas de curso pela contribuição ao meu trabalho, e no meu crescimento profissional.



## EPÍGRAFE

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”.

Antoine de Saint-Exupéry

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada”

Albert Einstein

“Não é na ciência que está a felicidade, mas na aquisição da ciência”

Edgar Allan Poe

## RESUMO

TUFFANI, Larissa de Paula – Padronização da Semi-Nested PCR e PCR em Tempo Real para detecção e quantificação do vírus da Mamilite Herpética Bovina. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

A mamilite herpética bovina, (bovine herpetic mammillitis, BHM), é uma doença vesicular e erosiva, cujo agente etiológico é o BoHV-2. Possui como propriedade a capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes. As lesões de mamilite podem ser confundidas com outras infecções de pele, como as causadas pelo vírus pseudocowpox e pelo vírus vaccínia. Já foram desenvolvidos métodos para amplificar regiões de genes para uso em PCR com o objetivo de detectar BoHV-2, e apesar da eficiência há poucos trabalhos com o uso de técnicas moleculares para sua detecção. Como os sinais clínicos são inconclusivos objetivou-se padronizar e validar os métodos moleculares *semi-nested* PCR (snPCR) e PCR em tempo real (qPCR), com a finalidade de fortalecer o diagnóstico laboratorial para doenças vesiculares, em apoio aos atendimentos dos Serviços de Defesa Sanitária Animal. Para a padronização, a cepa de vírus BoHV-2 mantida, na coleção do Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico foi analisada pelos dois métodos. A sensibilidade analítica da snPCR para BoHV-2 foi de  $1 \times 10^6$  cópias de DNA/ $\mu$ L, porém com a desvantagem de maior o risco de contaminação cruzada, enquanto que na qPCR, a sensibilidade analítica foi de  $1 \times 10^6$  cópias de DNA/ $\mu$ L, com eficiência de 1,9 e Slope de 3,4, com menor risco de contaminação e maior especificidade. Ficou evidenciado melhor desempenho da qPCR, devido à melhor eficiência, ou seja, menor custo e tempo, comparada com a snPCR. Foram testadas 193 amostras para BoHV-2 e 22 apresentaram resultado positivo tanto na snPCR quanto na qPCR, das positivas em 13 foi detectada coinfeção com os vírus vaccínia bovina e parapoxvirus. As amostras positivas ao BoHV-2 foram sequenciadas apresentando similaridade acima de 90%, com o gene da glicoproteína B herpética depositada no GenBank. Exames laboratoriais complementares devem ser usados para diferenciar os casos de doenças vesiculares detectadas clinicamente, sendo importante a inclusão da qPCR em apoio nas investigações de suspeitas, ampliando assim o escopo do diagnóstico laboratorial de doenças vesiculares e na vigilância virológica do BoHV-2. Conclui-se que o BoHV-2 é endêmico no Brasil, provocando lesões em tetos de vacas e por esse motivo deve ser incluído na lista de agentes investigados para confirmação do diagnóstico de doenças vesiculares a vírus, em apoio às ações do Programa Nacional de Erradicação de Febre Aftosa.

**Palavras chave: BoHV-2. Doenças Vesiculares. snPCR. qPCR. Diagnóstico Diferencial.**

## ABSTRACT

Tuffani, L.P.– Standardization of Semi-Nested PCR and real-time PCR for the detection and quantification of Bovine Herpetic Mammillite virus. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

Bovine herpetic mammillitis, BHM, is a vesicular and erosive disease, which the etiologic agent is BoHV-2. It has the capacity of establishing and reactivating latent infections. Lesions of BHM can be confounded with other skin infections as pseudocowpox and Vaccinia. Methods already have been designed to amplify genes' regions for PCR to detect BoHV-2 and despite to be efficient, there are few articles using molecular technic for BoHV-2 detection. Since the clinical signs are inconclusive, this project aimed at standardizing and validating through semi-nested PCR (snPCR) and Real Time PCR (qPCR), with the purpose of strengthening the laboratory diagnosis for vesicular diseases, to attend the Health Agency's demand on a differential diagnosis. To standardize the virus identification method, it was used the BoHV-2 virus tainted stocked at Bovine Viruses Laboratory of the Biological Institute, and it was analyzed through both methods. The snPCR analytical sensibility was  $1 \times 10^9$  copies of DNA/ $\mu$ L, however with the disadvantage of elevating the risk of cross contamination, meanwhile the qPCR was validated with the analytical sensibility of  $1 \times 10^9$  copies of DNA/ $\mu$ L, with efficiency of 1.9 and Slope of 3.4. with low risk of contamination and high specific. It was evident that the qPCR had a better performance, since it's more efficient, in other words, lower cost and run time when compared to the snPCR. In a total of 193 samples tested for BoHV-2, 22 were positive both in snPCR, and in qPCR, and 13 out of these 22 samples had coinfections with the virus of vaccinia and parapoxvirus. The BoHV-2 positive samples were sequenced and showed more than 90% similarity with the gene of Herpesvirus glycoprotein B on GenBank. Complementary laboratory tests should be used to differentiate cases of clinically detected vesicular diseases. It is important to include qPCR in support of suspicious investigations, thus broadening the scope of laboratory diagnosis of vesicular diseases and in virological surveillance of BoHV-2. In summary, the BoHV-2 is endemic in Brazil, causing lesions in cow's mams and being needed to include it on list of methods for differential diagnosis of vesicular diseases, in support to the National Program of Foot-and-mouth disease Eradication.

**Keywords: BoHV-2. Vesicular Diseases. snPCR. qPCR. Differential Diagnosis.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1a - Crosta nos tetos, seta branca, por mamilite herpética bovina ulcerativa (PASSOS, 2003)
- Figura 1b - Mamilite Herpética bovina ulcerativa: vesícula (seta branca), úlcera (setas pretas), e crosta (seta azul) no teto (PASSOS, 2003). 7
- Figura 2 - Primeira amplificação da snPCR em gel de agarose do material partindo do vírus padrão com título viral  $10^{-5.5}$  e realizando diferentes diluições a partir da  $10^{-6}$ . 21
- Figura 3 - Primeira amplificação da amostra na snPCR em diferentes temperaturas em gel de agarose. 21
- Figura 4 - Segunda amplificação da amostra na snPCR em diferentes temperaturas em gel de agarose. 22
- Figura 5 - repetição das melhores concentrações de *primers* da primeira amplificação, na segunda amplificação, visando um melhor resultado da snPCR, em gel de agarose correspondendo à tabela 9. 23
- Figura 6 - repetição das melhores concentrações de *primers* (400/500, 700/700, 700/900, 800/300) da segunda amplificação da snPCR em gel de agarose correspondendo à tabela 9. 24
- Figura 7 - purificado na primeira amplificação da snPCR em diferentes concentrações partindo de  $10^6$  cópias de DNA/uL realizando diferentes diluições. 25
- Figura 8 - purificado na segunda amplificação da snPCR em diferentes concentrações partindo de  $10^6$  cópias de DNA/uL realizando diferentes diluições. 25
- Figura 9 - gel da snPCR com os vírus padrão das doenças vesiculares BoHV-1 BoHV-5, Vaccínia, POX, pPOX e BoHV-2, respectivamente. 26
- Figura 10 - Curva de *Melting* do primeiro teste do qPCR com a amostra em diferentes diluições com a temperatura de *melting* a  $55^{\circ}\text{C}$ . 27
- Figura 11 - Curva de *Melting* da qPCR com a amostra em diferentes diluições e com temperatura de *melting* a  $57^{\circ}\text{C}$ . 28
- Figura 12 - Curva de amplificação do gradiente de concentração dos *primers* seguindo a tabela 9. 29
- Figura 13 - Curva de *Melting* do gradiente de concentração dos *primers*. 30
- Figura 14 - Curva de amplificação seguindo diferentes concentrações de *primer* (900/200, 900/300, 900/400, 900/500, 900/600, 900/700, 900/800, 900/700, 1000/900, 1000/1000). 31
- Figura 15 - Curva de *Melting* seguindo diferentes concentrações de *primer* (900/200, 900/300, 900/400, 900/500, 900/600, 900/700, 900/800, 900/700, 1000/900, 1000/1000). 32
- Figura 16 - Curva da qPCR do vírus purificado partindo da concentração de  $10^6$  cópias de DNA/uL 33

- Figura 17 - Curva padrão da qPCR realizada com o sistema SYBR *Green*. Valores da reação: Erro = 0,025; Eficiência = 1,960; Slope = -3,423. 33
- Figura 18 - Curva de Melting do purificado em diferentes concentrações, partindo da concentração de  $10^6$  cópias de DNA/uL 34
- Figura 19 - Curva de Amplificação com os vírus padrão das doenças vesiculares Pox, pPox, Vaccínia, BoHV-1, BoHV-2, BoHV-5 e FCM. 35
- Figura 20 - Árvore Filogenética comparando as amostras sequenciadas no LVB com os genes depositados no GenBank para glicoproteína B nos vírus BoHV-1, BoHV-2, BoHV-5, HSV-1 e HSV-2 e seus respectivos números de acesso. 37

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Concentração de agarose indicada para separação dos fragmentos de DNA.	13
Tabela 2 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na snPCR para BoHV-2 (CAMPOS et al., 2014).	15
Tabela 3 - Condições de ciclagem e temperatura das duas amplificações da snPCR.	15
Tabela 4 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na qPCR para BoHV-2.	17
Tabela 5 - Condições de ciclagem e temperatura das amplificações da qPCR.	17
Tabela 6 - <i>Mix</i> 1 e 2 de reagentes utilizados para a amplificação que precede ao sequenciamento.	19
Tabela 7 - Concentrações de <i>primers</i> utilizados para a amplificação precedente ao sequenciamento do BoHV-2.	19
Tabela 8 - Condições de ciclagem e temperatura da amplificação que precedem o sequenciamento do BoHV-2.	19
Tabela 9 - Concentrações dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> em nM.	22
Tabela 10 - porcentagem de amostras positivas para as Variola, Pseudovariola, Ectima e BoHV-2.	35

**LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1 - Tabela das amostras testadas, e os resultados positivos para os vírus citados.	47
Anexo 2 - Certificado do CETEA-IB frente e verso	53

**LISTA DE ABREVIATURAS**

Dez. – dezembro

Out. – outubro

Fev. – fevereiro

Ago. – agosto



## LISTA DE SIGLAS

BHM - *Bovine Herpetic Mammilitis*

BoHV-1 - Herpesvírus Bovino-1

BoHV-2 - Herpesvírus Bovino-2

BoHV-5 - Herpesvírus Bovino-5

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CT – *Threshold-Cycler*

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP - desoxinucleotídeo trifosfato

E - Eficiência da amplificação

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

F - *Forward*

FCM - Febre Catarral Maligna

FMD - *foot-and-mouth disease*, Febre Aftosa

gB - glicoproteína B

HSV-1 - Herpes Simplex Humano 1

HSV-2 - Herpes Simplex Humano 2

ICP - *Infected Cell Protein*

LVB - Laboratório de Viroses de Bovídeos

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDBK - *Madin and Darby Bovine Kidney*

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de Magnésio

orf – Ectima Contagioso

PCR - Reação em cadeia pela polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

pmol - picomolar

pox - Varíola

pPox - PseudoVaríola

qPCR - PCR em Tempo Real

R - *Reverse*

RPM - Rotações por Minuto

snPCR - *Semi-nested* PCR

TAE - Tris/acetato/EDTA

TBE - Tris / Borato /EDTA

T<sub>m</sub> - temperatura de *Melting*

UV - Ultra Violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

® - Marca Registrada

∞ - infinito

g - Grama

Kb - kilobase

Mg - miligrama

mL - mililitros

mM - Milimolar

ng - nanograma

nm - nanômetro

nM - nanoMolar

°C - Grau Celsius

pb - pares de base

V - Voltagem

w/V - massa/volume

μL - Microlitro

μM - Micromolar

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	VI
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	VII
<b>EPÍGRAFE</b> .....	IX
<b>RESUMO</b> .....	X
<b>ABSTRACT</b> .....	XI
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	XII
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XIV
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	XV
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
<b>3 REVISAO BIBLIOGRAFICA</b> .....	4
3.1 ETIOLOGIA.....	4
3.2 EPIDEMIOLOGIA.....	5
3.3 PATOGENESE.....	5
3.4 TRANSMISSÃO .....	6
3.5 SINAIS CLÍNICOS .....	6
3.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	7
3.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR .....	8
<b>3.7.1 PCR CONVENCIONAL</b> .....	8
<b>3.7.2 PCR EM TEMPO REAL OU QUANTITATIVA (QPCR)</b> .....	9
<b>4 MATERIAIS E METODOS</b> .....	11
4.1 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO.....	11
4.2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR.....	13
<b>4.2.1 ANÁLISE DO AMPLIFICADO</b> .....	16
4.3 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PCR QUANTITATIVA OU PCR EM TEMPO REAL	16
4.4 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS .....	18
4.5 AMOSTRAS.....	18
4.6 SEQUENCIAMENTO .....	18
<b>5 RESULTADOS</b> .....	21
5.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR.....	21

5.2	PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL .....	26
5.3	AMOSTRAS.....	35
5.4	SEQUENCIAMENTO .....	36
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
6.1	SEMI-NESTED PCR.....	39
6.2	PCR EM TEMPO REAL.....	40
6.3	AMOSTRAS.....	41
6.4	SEQUENCIAMENTO .....	41
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil assume a quarta posição em produção mundial de leite e derivados no mercado internacional de lácteos, perdendo apenas para União Européia, Estados Unidos e Índia (CONAB, 2016). Os produtores estão sempre investindo na modernização da produção, instalando tanques refrigerados, melhorando a alimentação do gado leiteiro, usando ordenha mecânica e investindo na saúde dos animais, prevenindo assim a redução de doenças que interferem na saúde pública (PONCHIO, GOMES; PAZ, 2005).

Essa modernização está em constante aceleração tecnológica, e hoje visa reduzir a quantidade de vacas utilizadas para a produção de leite, sem diminuir a quantidade produzida, na verdade aumentando a produtividade com o aumento do potencial genético do rebanho, crescendo assim a oferta mundial e reduzindo custos, sem diminuir a qualidade de produção (VILELA, 2011).

Neste cenário de aumento da exportação, torna-se fundamental a adoção de medidas que contribuem com a vigilância sanitária em rebanhos, com ênfase ao diagnóstico diferencial de febre aftosa, além de outras doenças vesiculares confundíveis (MAPA, 2015).

Doenças vesiculares são de grande importância para o gado, pois além de impactos diretos, seus sinais clínicos podem ser confundíveis com os da febre aftosa, uma doença de alta morbidade, que gera perdas diretas causadas pela baixa produção de leite, perda de peso e perdas indiretas por causa da imposição de barreiras sanitárias.

Entretanto, o diagnóstico diferencial é sempre um desafio, pelas dificuldades de abranger todos os agentes causadores, e assim oferecer resultados conclusivos, sendo necessário iniciar pelos mais prováveis agentes causadores das doenças vesiculares, como febre aftosa, estomatite vesicular, pseudovariola bovina, vaccínia bovina, ectima contagioso, BoHV-2, febre catarral maligna, dentre outras, diminuindo a lacuna diagnóstica de casos clínicos sem resposta.

Novos métodos diagnósticos para contribuição e elucidação de casos de doenças como BoHV-2 tornam-se imprescindíveis, sendo que as técnicas moleculares oferecem vantagens em comparação a outros testes, como por exemplo a vírus neutralização, por apresentarem elevada especificidade e sensibilidade, permitindo a identificação do agente infeccioso, seja ele infectante ou não, além de diminuir o tempo do resultado. A disponibilidade de utilização de um processo único, como a técnica da PCR em tempo real (qPCR), ou mesmo sua associação com outras técnicas moleculares como

semi-nested PCR (snPCR), pode auxiliar na padronização de aquisição de reagentes, material de consumo, equipamentos e treinamento de pessoal.

Assim, o presente trabalho, além de ampliar e disseminar o conhecimento sobre o Herpesvírus Bovino tipo 2 (BoHV-2), que possui uma carência de dados, visa contribuir para a melhoria da qualidade sanitária dos bovinos, proporcionando incremento a produtividade dos rebanhos e auxiliar os órgãos de defesa sanitária na tomada de medidas específicas de combate. Baseado nesse conhecimento será possível realizar o suporte de diagnóstico de doenças vesiculares, propiciando melhor atendimento aos casos suspeitos, ação fundamental dos serviços da defesa sanitária animal no processo de avaliação e certificação da condição sanitária dos rebanhos brasileiros e pilares para credibilidade internacional.

## 2 OBJETIVOS

### **Geral**

Padronizar métodos moleculares (snPCR e qPCR) para análise de BoHV-2 e detecção do agente etiológico em amostras oriundas de investigação epidemiológica pelo Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal, devido à suspeita de doença vesicular.

### **Específicos**

- 1- Avaliar métodos de extração de DNA em amostras de mucosa e pele;
- 2- Padronizar e validar a técnica da snPCR para detecção de BoHV-2;
- 3- Padronizar e validar a qPCR para detecção do BoHV-2;
- 4- Analisar pelos métodos snPCR e qPCR amostras de mucosa e pele de vacas com doença ulcerativa (suspeira de doença vesicular);
- 5- Sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas;



### 3 REVISAO BIBLIOGRAFICA

A Mamilite herpética bovina (*bovine herpetic mammillitis*, BHM), cujo agente etiológico é o BoHV-2 é uma doença vesicular e erosiva, de distribuição mundial, que pode afetar animais de todas as idades, causando lesões no úbere e tetos de fêmeas bovinas. Essas lesões são mais comuns em rebanhos com alta produção leiteira, e podem lesionar o focinho de bezerros lactantes. Apesar de alta taxa de infecção, a morbidade é baixa (ALMEIDA et al., 2008).

#### 3.1 ETIOLOGIA

O BoHV-2 é um vírus de DNA, envelopado, pertencente ao gênero *Simplex* vírus, subfamília Alphaherpesvirinae, família Herpesviridae, gênero *Simplexvirus*, espécie *Bovine alphaherpesvirus 2* (ICTV, 2015), relacionado com o vírus do herpes simplex humano (HSV-1 e HSV-2), assumindo uma diferença entre os herpes vírus bovino tipo 1 e 5 (BoHV-1 e BoHV-5) (ROIZMAN et al., 1992). Possui como propriedade a capacidade de estabelecer e reativar infecções latentes, assim mantendo-se na natureza e podendo ressurgir (TORRES et al., 2009a).

O BoHV-2 possui como organização genômica o tipo “E”, que é semelhante aos quatro isômeros do genoma presente nos herpes vírus humano. As sequências dos genes como UL23 (timidinaquinase), UL27 (glicoproteína B), UL28 e UL29 (“*infected cell protein*” – ICP 18.5 e 8) compartilham o maior grau de similaridade com os HSV-1 e HSV-2, herpes vírus humano, do que com outros herpes vírus bovino. A relação é tão próxima que há especulações de que o BoHV-2, durante a evolução, divergiu dos primatas (MCGEOH; COOK, 1994). Por estar relacionado com o HSV-1 e HSV-2, pois os epítomos das glicoproteínas de envelope são os mesmos, o BoHV-2 pode ser usado para teste de drogas antivirais humano ou em terapia animal (TORRES et al., 2009b).

O BoHV-2 foi isolado pela primeira vez em 1957 na África do Sul, de bovinos com lesões na pele, posteriormente em Ruanda Urandi a partir de lesões nos tetos de vacas leiteiras. Em outros países foi demonstrada a ocorrência do vírus, como no Quênia em 1968, Reino Unido em 1971, Estados Unidos da América em 1972, Austrália em 1974 e Japão em 2005. Sorologia positiva foi detectada em ruminantes selvagens, cuja participação na epidemiologia da doença ainda é incerta (ALMEIDA et al., 2008). A importância do BoHV-2 como agente de mamilite só foi destacada em 1964, após ser isolado de uma doença ulcerativa de tetos de vacas leiteiras (CAMPOS, 2012).

### 3.2 EPIDEMIOLOGIA

O BoHV-2 possui distribuição mundial, sendo de importante repercussão sanitária, principalmente em gado leiteiro, porém, no Brasil, há escassez de informações sobre a ocorrência da infecção. O vírus foi isolado em nosso país nas décadas de 70 e 80, e a partir daí há poucos relatos de presença do vírus nos rebanhos nacionais.

O vírus foi isolado no Brasil pela primeira vez em 1977 por Alice, a partir de lesões nos tetos de vacas leiteiras, em contraste com outros alfa herpesvírus de animais e humanos, permanecendo muitos aspectos de sua biologia desconhecidos, como o sítio de latência viral. Campos (2012) realizou experimentos para reativação da infecção e tentativas de recuperar o vírus via cultivo de explantes de gânglios trigêmeos nervosos bovinos, contudo os dados foram inconsistentes e o local onde o vírus pode permanecer latente continua desconhecido. Foi relatado também que o isolamento do vírus só é possível durante a fase exsudativa das lesões, por um curto período, e o rompimento das vesículas e a dessecação das lesões dificultam a recuperação do vírus por isolamento.

### 3.3 PATOGENESE

Até o presente momento, a escassez de informações sobre o BoHV-2 não permite uma conclusão sobre a patogênese.

Em vacas, além das lesões nos tetos e úbere, também podem ser observadas concomitantemente ulcerações na boca nos bezerros durante a fase lactante. Os sintomas iniciam com erupções circunscritas que progridem para vesículas, pústulas, rompendo-se e formando crostas e ulcerações. Infecções severas por BoHV-2 podem evoluir para mastite. No entanto, a maioria das infecções por BoHV-2 são assintomáticas (STEFANO et al., 2006). Todo bovino infectado pelo BoHV-2 continuará permanentemente infectado por toda a vida. O vírus passa a um estado de latência após a infecção, podendo ser reativado em situações de estresse ou baixa imunológica, essa característica torna difícil erradicar o BoHV-2 das propriedades infectadas (IMAI et al., 2005).

A resposta à infecção por esses vírus é muito variável, havendo animais sem lesões, com lesões moderadas e com lesões erosivas severas, de cura lenta e cuja ulceração profunda é frequentemente infectada secundariamente. Inicialmente há inchaço doloroso e avermelhamento da pele do teto. Algum tempo depois formam-se vesículas de formato irregular, que quando se rompem deixam uma superfície ulcerada. Forma-se uma fina crosta vermelho-escura. As lesões podem se unir e afetar a

maior parte da pele do teto e frequentemente muito da pele do úbere. Uma consequência comum é a infecção bacteriana. As lesões tipicamente se curam em 2-3 semanas, porém algumas lesões ulceradas podem persistir por meses. Novilhas recém-paridas (2-3 semanas pós-parto) são usualmente as mais severamente afetadas, sugerindo disseminação contagiosa na ordenha, ou que o estresse do primeiro parto afeta a ocorrência da doença. Como todas as infecções por herpes, o vírus permanece latente e as lesões podem recorrer (PASSOS, 2003).

### 3.4 TRANSMISSÃO

O modo de transmissão ainda não foi totalmente esclarecido, a infecção pode se perpetuar por meio dos portadores da infecção latente, que ocasionalmente reativam a infecção e a transmitem a animais susceptíveis, por contato direto, pela ordenha ou por fômites (TORRES et al., 2009b), bem como acredita-se no envolvimento de insetos como vetores mecânicos (STEFANO et al., 2006). A doença pode se espalhar rapidamente pelo rebanho, podendo estar restrita aos animais recém adquiridos ou jovens (IMAI et al., 2005).

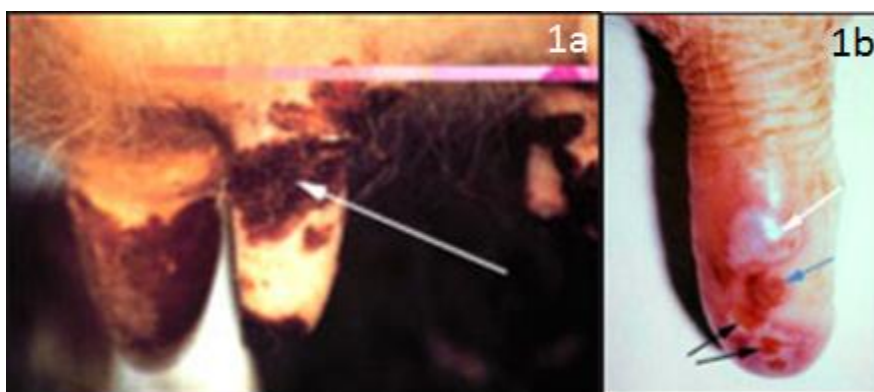
### 3.5 SINAIS CLÍNICOS

A infecção pelo BoHV-2 tem sido associada à duas formas clínicas distintas: lesões vesiculares e erosivas localizadas nos tetos ou no úbere (mamilite herpética) e lesões nodulares disseminadas na pele (*pseudo lumpy skin disease*).

A mamilite é considerada uma enfermidade frequentemente benigna e auto limitante, mas em alguns casos as vesículas se rompem formando ulcerações, essas lesões dificultam a ordenha, predisõem a mastites, reduzindo assim a produção de leite, podendo levar ao descarte prematuro das vacas afetadas (TORRES et al., 2009b). O processo de ordenha pode fazer com que uma vesícula se transforme em uma pústula, e resulte em ulcerações pela fricção por romper as lesões, resultando em queda na produção de leite, e deixando os animais mais susceptíveis à mastite bacteriana ou até mesmo à mastite crônica. Campos (2012) relata que 22% de vacas infectadas com BoHV-2 desenvolvem mastite, destacando desta forma, a importância desse vírus como porta de entrada a infecções bacterianas secundárias. A maioria dos animais soroconverte sem apresentar sinais clínicos.

As lesões podem ser brandas e até severas que podem demorar para cicatrizar, irregulares, vermelhas bem escuras, e podem ser confundidas com outras infecções de pele, como as causadas pelos vírus pseudocowpox, vaccínia, cowpox, da febre aftosa e da estomatite vesicular, com isso os sinais

clínicos são inconclusivos (STEFANO et al., 2006). A mastite pode causar edema e vermelhidão da pele do teto, aumentar a sensibilidade causando inquietação na vaca. Os sinais clínicos iniciam como máculas, segue para pápulas, pústulas, crostas e úlceras. Bezerros lactantes também podem ser afetados, apresentando lesões no focinho e mucosa bucal. A cura espontânea acontece de duas a três semanas.



*Figura 1a - Crosta nos tetos, seta branca, por mamilite herpética bovina ulcerativa (PASSOS, 2003)*

*Figura 1b - Mamilite Herpética bovina ulcerativa: vesícula (seta branca), úlcera (setas pretas), e crosta (seta azul) no teto (PASSOS, 2003).*

Os surtos de mamilite herpética podem tornar a ordenha muito difícil, nesses casos podem causar um declínio de 20% na produção de leite (EHLERS et al., 1999).

### 3.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

A mamilite quando se manifesta clinicamente, acarreta impactos econômicos, pois reduz a produção leiteira devido às mastites intercorrentes, trás mais despesas pelo custo no tratamento, causa perdas pelo descarte do leite, dificuldade de ordenha, além do aumento da ocorrência de infecções bacterianas secundárias. Por se tratar de doença confundível com febre aftosa e estomatite vesicular, doenças de notificação obrigatória imediata, se a suspeita dessas doenças não for descartada, a propriedade é interdita até que seja realizado diagnóstico diferencial, portanto a rapidez nessas análises é determinante para evitar injustiças e prejuízos à pecuária nacional (SCOTT, 1989).

### 3.7 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

O BoHV-2 apresenta um grande desafio de diagnóstico clínico, por ser confundível com outras doenças vesiculares. A PCR tem sido usada na identificação de genomas virais ou fragmentos genômicos por técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, baseando-se na replicação do DNA, tendo como objetivos a amplificação de uma região alvo no DNA viral. Por ser um teste de alta sensibilidade e especificidade, a PCR leva vantagem em relação a outros testes, apresenta maior rapidez de execução, sendo liberado o resultado em poucas horas se usada a qPCR. A PCR pode ser usada em amostras que contém o vírus inativado ou no estado latente (CAMPOS et al., 2014). Apesar do uso consagrado para a maioria das doenças, há escassez de dados de seu uso no diagnóstico do BoHV-2.

#### 3.7.1 PCR CONVENCIONAL

A PCR, reação da polimerase em cadeia (em inglês *polymerase chain reaction*) foi desenvolvida na década de 80 por Kary Mullis, causando uma mudança revolucionária na biologia, nas pesquisas, nos diagnósticos e no melhoramento genético (MARTINS, 2014).

PCR se trata de síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA com uma enzima DNA polimerase (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um *primer* (par de oligonucleotídeos), que são pequenas sequências sintetizadas artificialmente de DNA, que se ligam com especificidade à região alvo.

Para realização da PCR usa-se um *mix* que com as temperaturas e o tempo adequados fazem com que ocorra a amplificação do DNA. A PCR é composta por três etapas, formando o ciclo da PCR: A primeira etapa é a desnaturação, onde ocorre o aumento da temperatura, levando ao rompimento das pontes de hidrogênio; o DNA perde a estrutura de dupla hélice, e os *primers* se ligam à região complementar. A segunda etapa é o anelamento, onde os *primers* se ligam nas respectivas regiões alvo, cada *primer* possui uma temperatura específica de anelamento. A terceira etapa é a Extensão, onde começa a síntese da nova fita com alta temperatura e ação da Taq-DNA-polimerase, junto com os *primers*, formando novas fitas dupla hélice de DNA correspondente a região-alvo de amplificação delimitada pelos *primers*. Esse processo é repetido várias vezes para obtenção de grande quantidade de DNA amplificado. Esse ciclo forma um crescimento exponencial do número das sequências em progressão geométrica. Após completar os ciclos de amplificação, realiza-se a eletroforese, a fim de visualizar a amplificação do segmento alvo (MARTINS, 2014).

O princípio da eletroforese é baseado no fato de que a molécula de DNA possui carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino. Quando aplicada ou imersa em uma matriz, e submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (cátodo), sendo que a velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Em um dado momento da eletroforese, moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz. Dependendo do tamanho dos fragmentos é utilizada um tipo de matriz devido a diferença dos poros destas (YUNG-SHARP; KUMAR, 1989).

A separação de fragmentos é feita no gel de agarose, um polissacarídeo gelatinoso, que é capaz de separar fragmentos de 0,2 kb a 50 kb (1kb=1000 pares de base), este pode-se ajustar a concentração adaptando para separar os fragmentos presentes, separação feita por uma passagem de corrente elétrica gerada por uma fonte (REINIGER et al., 2004).

As amostras devem ser misturadas à corantes (azul de bromofenol e xileno cianol), que facilitam a aplicação da amostra e o monitoramento da corrida e reagentes de alta densidade, assegurando, que as amostras de DNA sejam depositadas no poço.

Um marcador de massa molecular (*ladder*) também é aplicado, a fim de permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA, permitindo comparar o tamanho dos fragmentos presentes nas amostras (REINIGER et al., 2004).

Para visualização da molécula de DNA no gel usa-se um corante (*GelRed* - Uniscience®) que fluoresce na luz ultravioleta. Esse método pode detectar uma quantidade igual ou maior que 10 ng de DNA, cuja intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de DNA (YUNG-SHARP; KUMAR, 1989).

Os grupos de moléculas de DNA do mesmo tamanho que migram na agarose assumem a forma do poço e constituem as bandas de DNA com a corrida. Sua visualização é obtida sob a luz ultravioleta e os resultados são registrados em foto-documentador utilizando um *software* capaz de transformar em imagem a intensidade relativa de fluorescência emitida pelas bandas de DNA que foram captadas por uma câmera fotográfica digital que registra a foto do gel.

### **3.7.2 PCR EM TEMPO REAL OU QUANTITATIVA (QPCR)**

A diferença básica entre a PCR convencional e a PCR em tempo real é que a esta última consegue monitorar o progresso da PCR ao longo dos ciclos, coletando os dados no decorrer da reação. A qPCR ocorre em um sistema fechado e é monitorada através de um programa que avalia a evolução da

técnica por meio de detecção de fluorescência dos produtos amplificados no final de cada ciclo (MACKAY, ARDEN, NITSCHKE, 2002).

Durante a amplificação, a fluorescência mede a quantidade de DNA sintetizado, proporcional a quantidade de DNA formada, permitindo conhecer e registrar durante as sucessivas fases da reação a sua cinética da amplificação (COSTA, 2004). A qPCR economiza o tempo da corrida do gel da PCR convencional, obtendo o resultado durante a amplificação.

### **3.7.2.1 PCR EM TEMPO REAL OU QUANTITATIVA (QPCR) - SISTEMA SYBR® GREEN**

O sistema SYBR® Green utiliza o corante SYBR Green para detectar produtos de PCR através da sua ligação a todo DNA de dupla-fita formado durante a reação, já que é intercalante, se liga a cada nova cópia de DNA, conforme vai progredindo a reação, mais DNA amplificado é gerado resultando no aumento da intensidade da fluorescência (MARTINS, 2014).

No final de cada reação, uma curva de dissociação é utilizada para verificação da especificidade e para analisar a presença de dímeros ou outros produtos inespecíficos de amplificação (MARTINS, 2014).

A curva de dissociação é baseada na aplicação de um gradiente de temperaturas depois da PCR, monitorando a cinética de dissociação dos fragmentos amplificados, comparando assim se a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) do DNA amplificado é compatível com a do DNA avaliado (COSTA, 2004).

A qPCR é um teste rápido, de alta sensibilidade e alta especificidade, possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras com títulos virais muito baixos ou inativados (MARTINS, 2014).

Essa técnica não exige manipulação pós-amplificação, ficando o processo em um “sistema fechado”, diminuindo os falsos positivos e as contaminações cruzadas entre as amostras. Pode-se também fazer um maior número de amostras em menos tempo, possibilitando tomadas de decisões rápidas, nos casos de doenças de barreiras (HIGUCHI et al., 1993).

## **4 MATERIAIS E METODOS**

### **Animais e obtenção do material clínico**

O manejo dos animais seguiu os procedimentos aprovados pelo Comitê de Ética do Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, protocolo número 66/2008, seguindo diretrizes estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Animais de Laboratório e pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA). O Laboratório de Viroses de Bovídeos/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico (LVB/IB) possui autorização do MAPA para manipulação de amostras suspeitas de doença vesicular desde que seja descartada a possibilidade de Febre aftosa e estomatite vesicular.

### **Vírus padrão**

Utilizou-se a amostra do vírus BoHV-2, proveniente do Instituto Robert Koch Berlin – Alemanha, armazenada em nitrogênio líquido. A inoculação desse vírus foi realizada em células MDBK, cujo título na 7ª passagem em MDBK foi de  $10^{-5,5}$ .

### **Amostras clínicas**

Amostras de 193 vacas com lesão vesicular, com suspeita de poxvirus e parapoxvirus foram coletadas pelo Serviço de Defesa Animal, no período de 2010 a 2016. Esses materiais (crostas, amostras epiteliais e isolados), foram analisados no LVB/IB para obtenção de diagnóstico diferencial doenças vesiculares.

### **Métodos moleculares**

Foram padronizadas e validadas as técnicas de snPCR e qPCR para detecção do BoHV-2.

#### **4.1.1 EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL UTILIZANDO KIT COMERCIAL**

Utilizou-se o kit de extração de DNA da empresa ZYMO RESEARCH, Quick-DNA™ UNIVERSAL KIT. O procedimento da extração foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante.

### **Isolados em cultura celular**

Para cada 200 µL de solução viral adicionou-se 200 µL de BioFluid & Cell Buffer (Red) e 20 µL de proteinase K, homogeneizou-se por 15 segundos, incubou-se a 55°C por 10 minutos. Adicionou-se 420 µL de Genomic Binding Buffer ao sobrenadante, homogeneizou-se por 15 segundos. A mistura



dessa solução foi transferida para um microtubo contendo coluna de sílica (Zymo-Spin™ IIC-XL Column) e submetido à centrifugação por 12000 rpm a 25° C durante 1 minuto, em centrífuga para microtubos. Posteriormente, o filtrado foi descartado e a coluna de sílica foi então transferida para um tubo de coleta, acrescida de 400 µL de DNA Pre-Wash Buffer e submetida à centrifugação por 12000 rpm a 25° C 1 minuto. O filtrado foi descartado e a centrifugação repetida por mais um minuto para remoção de qualquer resíduo do tampão. Ao final foram adicionados 50 µL de tampão de eluição (DNA Elution Buffer), diretamente no centro da coluna de sílica, sem tocar a membrana. Após incubação por 5min a 25° C o material foi submetido à centrifugação a 12000 rpm a 25° C por 1 minuto . Armazenou-se o DNA eluído a -20°C. Para obter maior rendimento de DNA o último passo foi repetido.

## **Tecidos**

Vinte e cinco miligramas de tecido de epitélio ou crosta de cada amostra foram seccionados, com auxílio de bisturi, em fragmentos pequenos e transferidos para tubos Eppendorf®. Em seguida adicionou-se 95 µL de água, 95 µL Soli dTissue Buffer (Blue) e 10 µL de proteinase K, homogeneizou-se por 15 segundos e incubou-se a 55°C até a completa dissolução do tecido. Adicionou-se 200 µL de Genomic Binding Buffer ao sobrenadante, homogeneizou-se por 15 segundos. A mistura dessa solução foi transferida para um microtubo contendo coluna de sílica (Zymo-Spin™ IIC-XL Column) e submetido à centrifugação por 12000 rpm a 25° C durante 1 minuto, em centrífuga para microtubos. Posteriormente, o filtrado foi descartado e a coluna de sílica foi então transferida para um tubo de coleta, acrescida de 400 µL de DNA Pre-Wash Buffer e submetida à centrifugação por 12000 rpm a 25° C 1 minuto. O filtrado foi descartado e a centrifugação repetida por mais um minuto para remoção de qualquer resíduo do tampão. Ao final foram adicionados 50 µL de tampão de eluição (DNA Elution Buffer), diretamente no centro da coluna de sílica, sem tocar a membrana. Após incubação por 5min a 25° C o material foi submetido à centrifugação a 12000 rpm a 25° C por 1 minuto . Armazenou-se o DNA eluído a -20°C. Para obter maior rendimento de DNA o último passo foi repetido.

## 4.2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR

Como ponto de partida, baseou-se inicialmente na metodologia descrita por CAMPOS et al. (2014), contudo, foram necessários ajustes na temperatura e nas concentrações de *primers* para melhorar o desempenho desse método.

Para a padronização da snPCR foram utilizadas diluições seriadas da amostra padrão de BoHV-2, com título  $10^{-5,5}$ . Essa amostra foi amplificada pela PCR convencional (utilizando os *primers* da tabela 2) e submetida a eletroforese em gel de agarose 2%. O gel foi preparado misturando um tampão (TBE=Trisborato-EDTA ou TAE= Tris-acetato-EDTA) e agarose (tabela 1), em uma cuba com o tampão de eletroforese, cujos fios de platina atuam como cátodo e ânodo, provocando a passagem de corrente elétrica pelo gel gerada por uma fonte de eletricidade. A voltagem é determinada calculando a distância entre os eletrodos, não o comprimento do gel, sendo recomendada uma voltagem entre 50V e 110V (REINIGER et al., 2004).

Tabela 1 - Concentração de agarose indicada para separação dos fragmentos de DNA.

Concentração de agarose (% [w/v])	Faixa de tamanho dos fragmentos de DNA eficientemente separados (kb)
1	0,5- 10,0
1,2	0,4- 6,0
1,5	0,2-3,0
2	0,1-2,0

Para visualização da molécula de DNA no gel utilizou-se um corante (*GelRed*), que se intercala entre as bases dos ácidos nucleicos na presença de luz Ultravioleta (UV) (entre 260 e 320 nm) e fluoresce em vermelho alaranjado (590 nm) (YUNG-SHARP; KUMAR, 1989).

Os resultados das amostras foram visualizados no transluminador e revelaram banda na altura correspondente a 608 pb na primeira amplificação.

As bandas visualizadas foram cortadas com o auxílio de um bisturi, e o material foi purificado utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purifications – Promega (segundo as recomendações do fabricante) e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das demais análises. A sensibilidade analítica foi determinada dosando a concentração do DNA viral quantificado no QuantiFluor® dsDNA System de acordo com o manual do fabricante. No valor dado em massa foi feito um cálculo para verificar o número de cópias por microlitro, utilizando a calculadora *online* disponível em

“<http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>” obtendo o número de  $1,25 \times 10^{10}$  cópias de DNA/uL. A partir dessa amostra foi feita uma diluição seriada na base 10.

Para a amplificação do ácido nucléico pela PCR convencional utilizou-se PCR Master Mix (Promega) contendo 50 unidades/mL de Taq DNA polymerase em buffer (pH 8,5) (enzima polimerase responsável pela síntese de novas fitas de DNA), 400 µL de dATP, 400 µL de dGTP, 400 µL de dCTP, que são desoxinucleotídeos (dNTPs), 400 µL de dTTP e 3 mM MgCl<sub>2</sub>, segmento de pares de base a ser amplificado do DNA extraído da amostra, dois iniciadores específicos para a região alvo (*primer*) e água para completar o volume da reação (*Nuclease-free Water*) (MARTINS et al., 2016).

Inicialmente fez-se um gradiente de temperatura das duas amplificações, levando em conta a temperatura de *Melting* do *primer Forward* (56,1°C), do *Reverse* (59,2°C), foi feito um gradiente de 55°C a 63°C, e o produto da reação foi analisado em gel de agarose 2%.

Para a segunda amplificação usou-se o produto da primeira reação com o melhor resultado, temperatura 58°C, e fez-se um segundo gradiente de temperatura, igual ao primeiro, respeitando as temperaturas de *Melting* do *primer Forward* (56,1°C) e do *nReverse* (55,9°C) e analisando novamente em gel de agarose 2%.

As diluições em *Nuclease-free water* das amostras foram submetidas às condições de temperatura e testadas. Depois de obtidas as condições de temperatura padrão para os *primers* do BoHV-2, foi feito gradiente de concentração dos mesmos.

Primeiro foi ajustada a concentração do *primer Forward* na primeira amplificação, e depois do *primer Reverse* ainda na primeira reação. Somente com as concentrações escolhidas como ideais foi refeito o processo para a segunda amplificação, ajustando primeiro do *primer Forward*, e depois do *primer nReverse*.

Os *primers* usados têm como alvo o gene gB e detectam na primeira amplificação a região M21628: 6363...6070, amplificando um fragmento de 608 pb e na segunda amplificação M21628: 6363...6874, amplificando 512 pb.

Foi utilizado para amplificação do ácido nucléico utilizou o Kit comercial Taq PCR *Mix* e os *primers* da PCR primária (M21628, REGION: 6363...6070) *Forward* 5'-TATGGAGAAGGAAGAGCCCG -3' e *Reverse* 5'TTTTAGCCGCGTGGTGTGC 3' que amplifica um fragmento de DNA de 608 pares de base (pb) e os *primers* para snPCR (M21628, REGION:6363...6874) *Forward* 5'-TATGGAGAAGGAAGAGCCCG -3' *reverse* 2 5'-CGGTGGTCTCAAGGTTGTTC -3' na reação secundária que amplifica um fragmento de DNA de 512 pb.

Tabela 2 - Descrição dos primers utilizados na snPCR para BoHV-2 (CAMPOS et al., 2014).

Ensaio	Primer	Sequência	Gene Alvo/Região	Tamanho da amplificação (pb)	Referencia
snPCR 1ª amplificação	<i>Foward</i>	5'-TATGGAGAAGGAAGAGCCCG -3'	Glicoproteína B M21628: 6363...6070	608	CAMPOS et al. (2014)
	<i>Reverse</i>	5'TTTTTAGCCGCGTGGTGTGC 3'			CAMPOS et al. (2014)
snPCR 2ª amplificação	<i>Foward</i>	5'-TATGGAGAAGGAAGAGCCCG -3'	Glicoproteína B M21628: 6363...6874	512	CAMPOS et al. (2014)
	<i>snReverse</i>	5'-CGGTGGTCTCAAGGTTGTTC -3'			CAMPOS et al. (2014)

O *Mix* da primeira amplificação foi composto por 6 uL de *Nuclease-free water*, 0,5 uL do *primer Foward*, 1,0 uL do *primer Reverse*, 12,5 uL do *mix* e 5 uL da amostra, totalizando em 25 uL. O *mix* da segunda amplificação foi composto por 8,25 uL de *Nuclease-freewater*, 1,0 uL do *primer Foward*, 1,25 uL do *primer snReverse*, 12,5 uL do *mix* e 2 uL do produto da primeira amplificação. Na tabela 3 estão descritas as condições térmicas de ciclagem e temperatura para a primeira e segunda amplificações.

Tabela 3 - Condições de ciclagem e temperatura das duas amplificações da snPCR.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	3 minutos	1
94°C	50 segundos	35
58°C	50 segundos	
72°C	50 segundos	
72°C	3 minutos	1
4°C	Forever	∞

O vírus padrão foi purificado usando o *Wizard Genomic DNA Purifications Kit* – Promega e quantificado utilizando o *QuantiFluor® dsDNA System* de acordo com o manual do fabricante. O valor obtido em ng/uL foi convertido em cópias de DNA/uL através da calculadora online disponível em “<http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realttime-pcr>”. A amostra purificada foi diluída seguindo uma diluição seriada na base 10 nos padrões definidos de ciclagem e temperatura dos *primers*, mas só foram utilizadas as concentrações de  $10^6$  a  $10^0$  cópias de DNA/uL a fim de evitar desperdício de reagentes, sabendo que as maiores concentrações são detectadas mais facilmente, e visando detectar as menores concentrações.

#### 4.2.1 ANÁLISE DO AMPLIFICADO

O produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X à voltagem de 100V por 60 minutos. A visualização foi possível, pois adicionou-se à amostra *GelRed*® (Biotium) diluído em água (*Nuclease-free water*) a 1:150 e tampão de carregamento *LoadingDye, Blue* (6X) (ThermoScientific). Para visualização usou-se o transluminador sob luz UV (320 nm).

Os fragmentos foram comparados com um padrão de pares de base de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Invitrogen®). O resultado foi considerado válido pois o controle positivo apresentou banda no tamanho correspondente (608 pb na primeira amplificação e 512 pb na segunda amplificação) e no controle negativo houve ausência de banda.

Após a padronização, para confirmar a especificidade da snPCR, a corrida foi realizada com os vírus Vaccinia (orthopoxvirus), Pseudovariola bovina (pPox), Herpes vírus bovino tipo 1 e 5 (BoHV-1, BoHV-5), e Febre Catarral Maligna (FCM).

#### 4.3 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PCR QUANTITATIVA OU PCR EM TEMPO REAL

Como ponto de partida baseou-se inicialmente na metodologia descrita por Herlekar et al., (2013). Contudo também neste método foram necessários ajustes de concentração de *primers* e temperatura visando melhorar o desempenho.

Para a realização da qPCR usou-se o equipamento *Light Cycler* 480 (Roche) do Laboratório de Viroses de Bovídeos. O sistema utilizado foi o corante SYBR® Green.

Os iniciadores selecionados para amplificar foram os do gene da glicoproteína B para o BoHV-2.

Seguindo Herlekar et al. (2013), os *primers* foram M21628 F: 5'-TTC GCA CAA CCG CCT AAC-3' e R: 5'-CAA TCA GAG TCC GCC TTA CC-3' (tabela 4). Para a realização da qPCR foi usado o Brillhante qPCR SYBR *Green Master Mix*.

Assim como na snPCR foi feito um gradiente de temperatura respeitando a temperatura de *melting* do *primer forward* 55,9°C de e do *reverse* de 55,3°C. As temperaturas usadas para o gradiente foram de 54°C à 62°C, a concentração da amostra foi de 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/μL partindo do título viral de 10<sup>5,5</sup> TCID<sub>50</sub>/μL. Foram feitas várias corridas para analisar a melhor temperatura de anelamento.

Após a escolha da temperatura foi feito o gradiente de *primers*, seguindo a fórmula igual na snPCR para o *Forward* e depois para *Reverse*.

Tabela 4 - Descrição dos primers utilizados na qPCR para BoHV-2.

Primer	Sequência	Tamanho da amplificação (pb)	Referencia
<i>Foward</i>	5'-TTC GCA CAA CCG CCT AAC-3'	93	Herlekar, 2013
<i>Reverse</i>	: 5'-CAA TCA GAG TCC GCC TTA CC-3'		

O Mix da amplificação foi composto por 4,6 uL de *Nuclease-free water*, 1,8 uL do *primer Foward*, 1,6 uL do *primer Reverse*, 10 uL do Brillhante qPCR SYBR *Green Master Mix* e 2 uL da amostra, totalizando em 18 uL aplicados em placa para 96-poços. Na tabela 5 estão descritas as condições térmicas de ciclagem e temperatura para a amplificação da qPCR.

Tabela 5 - Condições de ciclagem e temperatura das amplificações da qPCR.

Nome da Fase	Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
Pré-Incubação	95°C	5 minutos	1
Amplificação	95°C	10 segundos	50
	57°C	20 segundos	
	72°C	60 segundos	
<i>Melting</i>	95°C	5 segundos	1
	65°C	1 minuto	1
Cooling	40°C	10 segundos	1

A validação e padronização da qPCR foi feita pela análise da sensibilidade analítica empregando diferentes diluições seriadas do vírus padrão BoHV-2 purificado em triplicata, correlacionando à snPCR.

A curva padrão pelo sistema SYBR®Green foi gerada através do ponto de corte dos valores do *Threshold Cycler* (Ct) em fase linear logarítmica de amplificação, frente às diluições do vírus, para calcular o coeficiente angular da reta (Slope) e para calcular a eficiência da amplificação (E).

O amplificado da amostra de referência foi usado também na qPCR. A fim de testar a sensibilidade analítica da reação, a corrida foi feita em triplicata e em três dias diferentes. A eficiência do teste foi de 1,9 e o slope-3,4.

As amplificações por esse método foram finalizadas com a curva de dissociação *Melting*, analisando a especificidade e ausência da formação de curvas secundárias de qualquer outro produto.

Assim como na snPCR, foi realizado uma reação com os vírus pPox, Vaccínia, BoHV-1, BoHV-5, e FCM, visando confirmar a especificidade.

#### 4.4 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Como controle positivo foi utilizado o vírus BoHV-2, estirpe de referência, que foi sequenciada e analisada no BLAST, já quantificada no QuantiFluor® dsDNA System de acordo com o manual do fabricante, e realizadas as diluições seriadas. Para controle negativo utilizou-se água ultrapura e amostra de epitélio de teto certificada livre de BoHV-2, analisada por microscopia eletrônica e por isolamento viral.

#### 4.5 AMOSTRAS

Estando padronizadas as corridas foram selecionadas 193 amostras (crosta, epitélio, suabe e macerado) armazenadas a -80°C no LVB, e realizadas a snPCR e qPCR para BoHV-2. Essas amostras foram previamente testadas para outras doenças

#### 4.6 SEQUENCIAMENTO

As amostras que apresentaram resultado positivo para BoHV-2 nas duas PCRs (snPCR e qPCR) e o vírus padrão de BoHV-2 foram selecionadas para o sequenciamento.

##### **Purificação do DNA**

Primeiro realizou-se as duas amplificações da snPCR e correu-se gel de agarose a 1% aplicando 25 uL de amostra, a fim de obter quantidade de DNA suficiente para purificação. Após a corrida do gel, com ajuda da luz UV do fotodocumentador cortou-se, com um bisturi, a banda visível na altura esperada do gel, depositou-se cada banda em um tubo de Eppendorf devidamente identificado. Cada amostra foi purificada utilizando o kit da Promega® seguindo o protocolo definido pela marca, e o purificado foi armazenado em freezer a -80°C.

##### **Amplificação para sequenciamento**

Antes de submeter as amostras purificadas ao sequenciamento realizou-se uma reação de PCR teste a fim de selecionar o melhor *mix* de amplificação e a concentração de *primer* ideal, utilizando o vírus padrão purificado. Testou-se dois *mix* para a amplificação (tabela 6) e um gradiente de concentração de *primer* em cada *mix*. (tabela 7). O tempo de corrida seguiu o protocolo do BigDye® (tabela 8).

Tabela 6 - Mix 1 e 2 de reagentes utilizados para a amplificação que precede ao sequenciamento.

Reagentes	Mix 1	Mix 2
<i>Big Dye</i>	2 uL	1 uL
<i>Sequencing Buffer</i> (5x)	2 uL	3 uL
<i>Primer</i>	1,5 uL	4 uL
DNA	4,5 uL	2 uL
Total	10 uL	10 uL

Tabela 7 - Concentrações de primers utilizados para a amplificação precedente ao sequenciamento do BoHV-2.

<i>Primers F/R</i>
2,5 pMol
2,75 pMol
3 pMol
3,25 pMol
3,5 pMol
3,75 pMol
4,0 pMol
4,25 pMol

Tabela 8 - Condições de ciclagem e temperatura da amplificação que precedem o sequenciamento do BoHV-2.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
95°C	1 minuto	1
95°C	30 segundos	35
50°C	15 segundos	
60°C	4 minutos	
4°C	Forever	∞

As amostras purificadas foram precipitadas utilizando o *kit big dye exterminator*, seguindo o protocolo descrito pela marca, antes de realizar-se a reação de sequenciamento no sequenciador 3500xL *Genetic Analyzer* utilizando o programa *3500 Data Collection Software* para ler as amostras sequenciadas.

### Sequenciamento

Após a escolha do *mix* ideal e da concentração dos *primers* à serem utilizadas, realizou-se o sequenciamento das amostras purificadas.

As amostras sequenciadas foram analisadas utilizando o programa *BioEdit*, alinhando as sequências utilizadas os *primers Forward* e *Reverse*. Com esse alinhamento montou-se uma sequência consenso que foi analisada no site



[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) a fim de verificar a similaridade dela com outras sequências depositadas no *GenBank*.

As sequências *Forward* e *Reverse* também foram analisadas.

Com as amostras analisadas, montou-se uma árvore filogenética utilizando o programa MEGA6 comparando as amostras com os genes previamente depositados no GenBank para BoHV-2 gB, BoHV-1 gB, BoHV-5 gB, HSV-1 gB e HSV-2 gB.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA SEMI-NESTED PCR

Para validar a sensibilidade da reação foram realizadas análises de diluições seriadas do vírus padrão BoHV-2. As amostras foram amplificadas utilizando os *primers* da tabela 2. Após a primeira amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%. Como resultado, evidenciou-se uma banda no gel na altura de 608 pb, como demonstrado na figura 2.

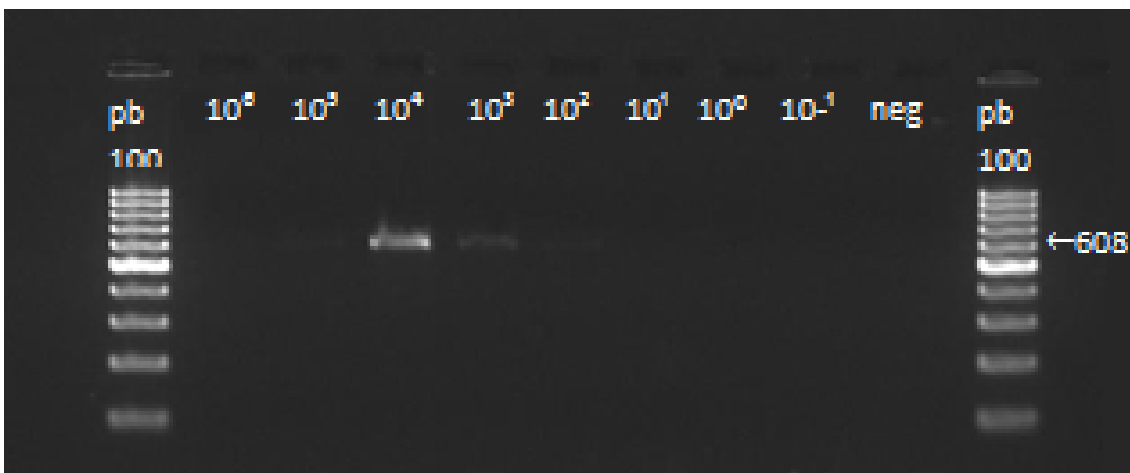


Figura 2 - Primeira amplificação da snPCR em gel de agarose do material partindo do vírus padrão com título viral  $10^{-5.5}$  e realizando diferentes diluições a partir da  $10^{-6}$ .

A partir desse gel, foi selecionada a concentração de  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/μL, apresentando menor intensidade de banda, para iniciar os ensaios de padronização da temperatura ideal (gradiente de temperatura), esta foi escolhida por ser a menor detectável, visando manter a reação sensível.

Os produtos amplificados pela reação de snPCR na primeira amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Promega®) obtendo-se o resultado demonstrado na figura 3.

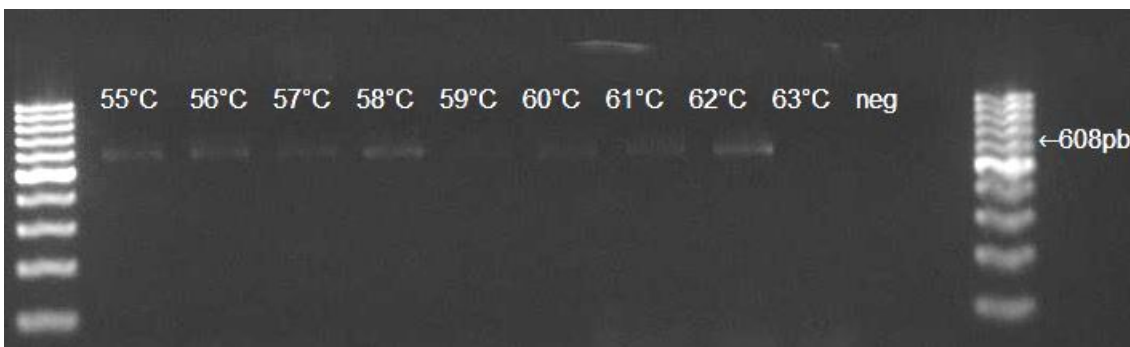


Figura 3 - Primeira amplificação da amostra na snPCR em diferentes temperaturas em gel de agarose.

Analisando a figura 3, foi selecionada a temperatura de 58°C como ideal de *melting*.

Para a segunda amplificação foi feito o mesmo gradiente de temperatura, com o produto da primeira amplificação, e analisado em gel de agarose 2% demonstrado na figura 4.

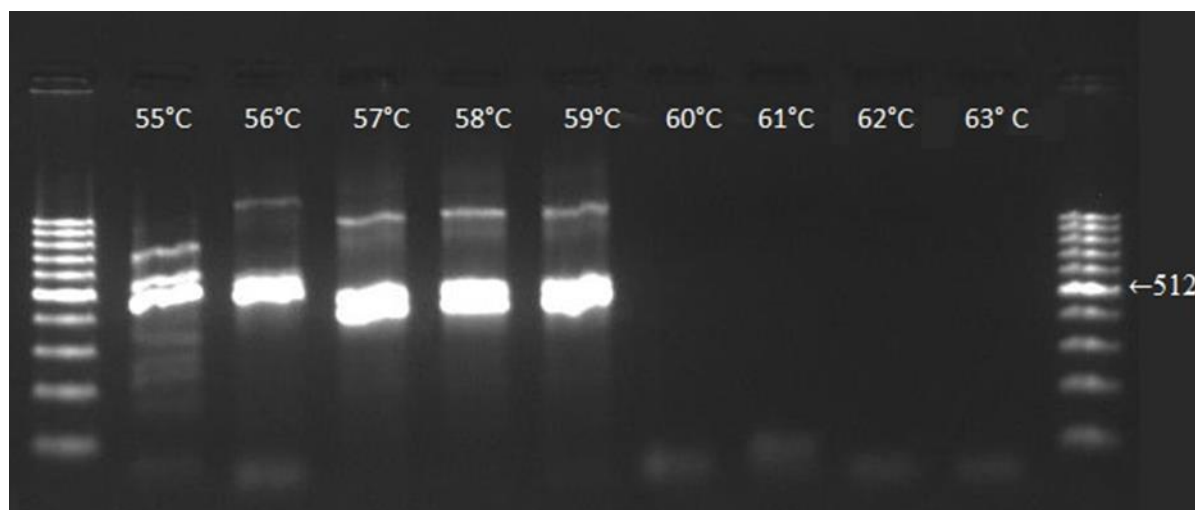


Figura 4 - Segunda amplificação da amostra na snPCR em diferentes temperaturas em gel de agarose.

Analisando a figura 4, a temperatura de *melting* selecionada foi 58°C, dando margem para realizar as mesmas condições de ciclagem e temperatura em ambas amplificações, alterando apenas as concentrações de *primers* e reagentes.

Depois de selecionada a temperatura ótima, foi feito o gradiente de concentração de *primers* representados em nM (tabela 9).

Tabela 9 - Concentrações dos *primers* forward e reverse em nM.

		Primer Forward							
		200	300	400	500	600	700	800	900
Primer Reverse	200	200/200	300/200	400/200	500/200	600/200	700/200	800/200	900/200
	300	200/300	300/300	400/300	500/300	600/300	700/300	800/300	900/300
	400	200/400	300/400	400/400	500/400	600/400	700/400	800/400	900/400
	500	200/500	300/500	400/500	500/500	600/500	700/500	800/500	900/500
	600	200/600	300/600	400/600	500/600	600/600	700/600	800/600	900/600
	700	200/700	300/700	400/700	500/700	600/700	700/700	800/700	900/700
	800	200/800	300/800	400/800	500/800	600/800	700/800	800/800	900/800
	900	200/900	300/900	400/900	500/900	600/900	700/900	800/900	900/900

Após os cálculos, as amostras com diferentes concentrações dos *primers* foram analisadas em eletroforese.

Após analisados os géis, selecionou-se as melhores concentrações, e repetiu-se as mesmas, mas dessa vez usando a segunda amplificação para melhor visualização das bandas (figura 5).

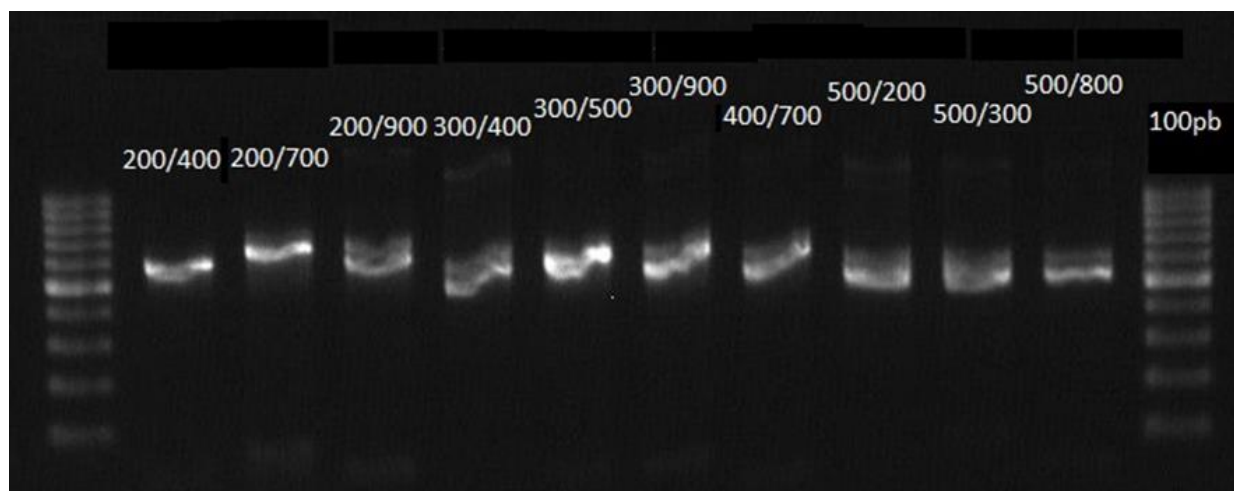


Figura 5 - repetição das melhores concentrações de primers da primeira amplificação, na segunda amplificação, visando um melhor resultado da snPCR, em gel de agarose correspondendo à tabela 9.

A partir dessa análise, foi selecionada a concentração 200/400, sendo 200 nM para o *primer forward* e 400 nM para o *reverse*, resultando em um *mix* para a primeira amplificação composto por 6 uL de *Nuclease-free water*, 0,5 uL do *primer Forward* a 10 pmol/uL, 1,0 uL do *primer Reverse* a 10 pmol/uL, 12,5 uL do PCR Master Mix (Promega) e 5 uL da amostra, vírus BoHV-2 padrão extraído, totalizando em 25 uL.

Para a segunda amplificação utilizou-se a tabela 9, onde novamente foram selecionadas as melhores concentrações e foi feita a repetição das mesmas (Figura 6), sendo selecionada a coluna 1, com concentração de 400 nM do *primer forward* e 500 nm do *snReverse*. O *mix* da segunda amplificação foi composto de 8,25 uL de *Nuclease- freewater*, 1,0 uL do *primer Forward* a 10 pmol/uL, 1,25 uL do *primer snReverse* a 10 pmol/uL, 12,5 do Master Mix (Promega) e 2 uL do produto da primeira amplificação.

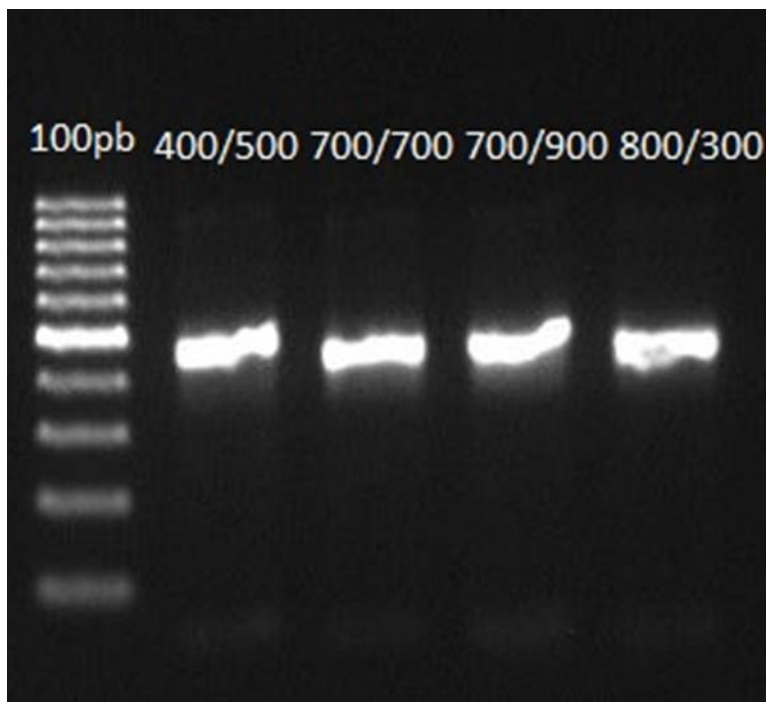


Figura 6 - repetição das melhores concentrações de primers (400/500, 700/700, 700/900, 800/300) da segunda amplificação da *snPCR* em gel de agarose correspondendo à tabela 9.

Após concluir os *mix* e as temperaturas, o vírus padrão foi purificado. Foi obtida uma concentração de 37,54 ng/uL em 2 uL do amplificado, ou seja, 18,77 ng/uL. Esse valor em massa foi convertido em cópias de DNA/uL através da calculadora online obtendo o número de  $1,25 \times 10^{10}$  cópias de DNA/uL. A partir dessa amostra foi feita uma diluição seriada na base 10, a fim de determinar a sensibilidade analítica da reação. Essas concentrações foram testadas nos padrões definidos de ciclagem, temperatura e concentrações de *primer*. Foi realizado um gel com o purificado diluído na primeira amplificação (figura 7) e na segunda amplificação (figura 8).

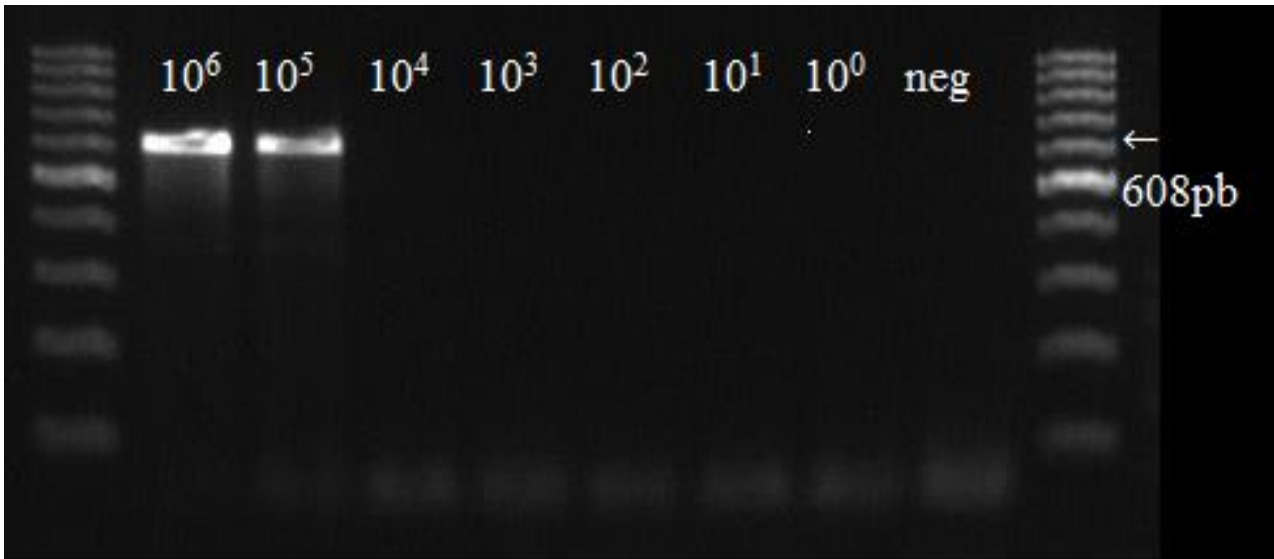


Figura 7 - purificado na primeira amplificação da snPCR em diferentes concentrações partindo de  $10^6$  cópias de DNA/uL realizando diferentes diluições.

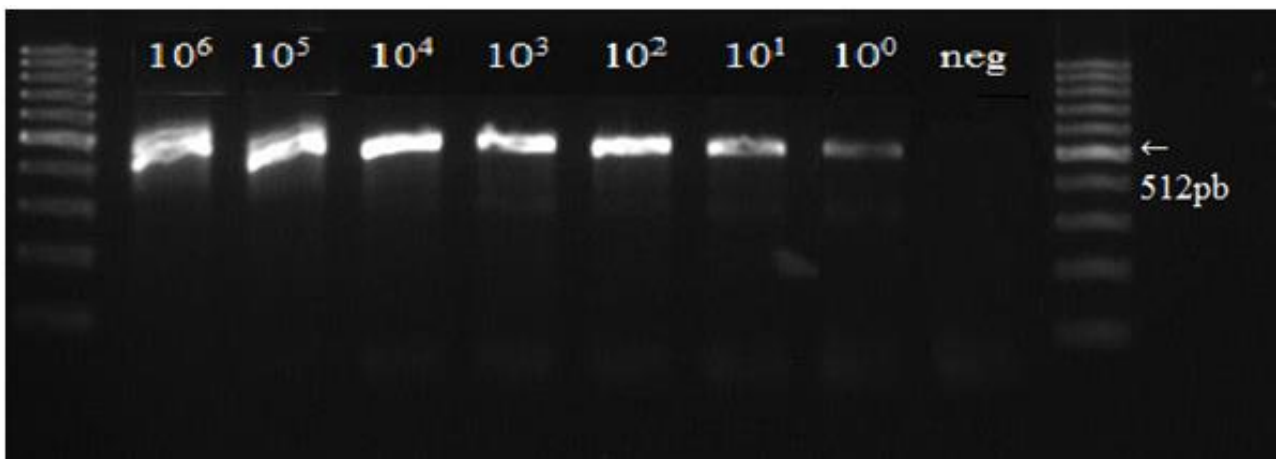


Figura 8 - purificado na segunda amplificação da snPCR em diferentes concentrações partindo de  $10^6$  cópias de DNA/uL realizando diferentes diluições.

Após definidas as temperaturas e concentrações de *primer* e a sensibilidade da reação, foi realizada uma corrida com vírus padrão do BoHV-2 e de outras doenças (pPox, Pox, Vaccinia, FCM, BoHV-1, BoHV-5) visando a comprovação da especificidade do método (figura 9).

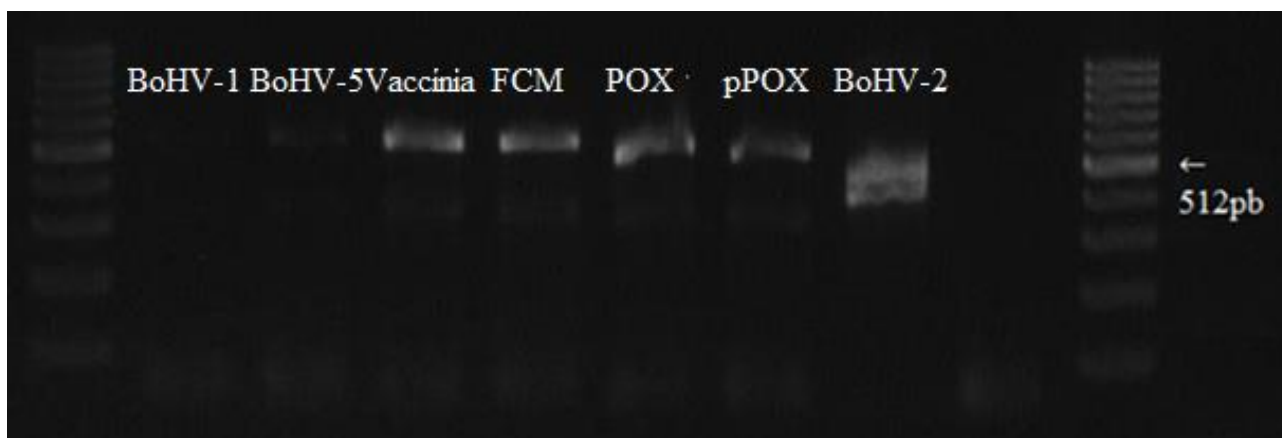


Figura 9 - gel da snPCR com os vírus padrão das doenças vesiculares BoHV-1 BoHV-5, Vaccinia, FCM, POX, pPOX e BoHV-2, respectivamente.

## 5.2 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

A validação e padronização da qPCR foi feita analisando a sensibilidade analítica desta. Para realização da otimização de temperatura foram realizadas corridas a fim de escolher a melhor temperatura de anelamento. A figura 10 representa a curva de *Melting* usando a temperatura de anelamento de 55°C, e na figura 11 a curva com a temperatura de anelamento 57°C.

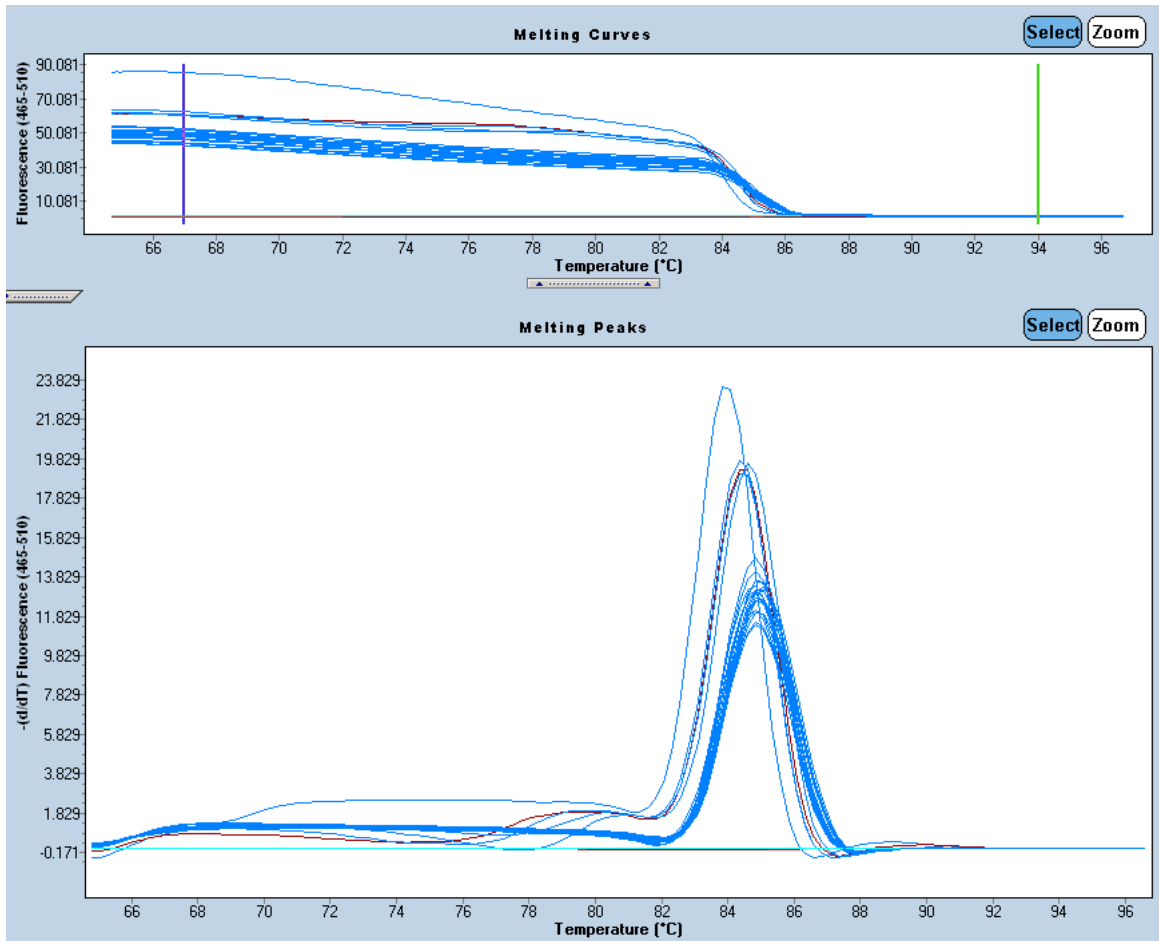


Figura 10 - Curva de Melting do primeiro teste do qPCR com a amostra em diferentes diluições com a temperatura de melting a 55°C.



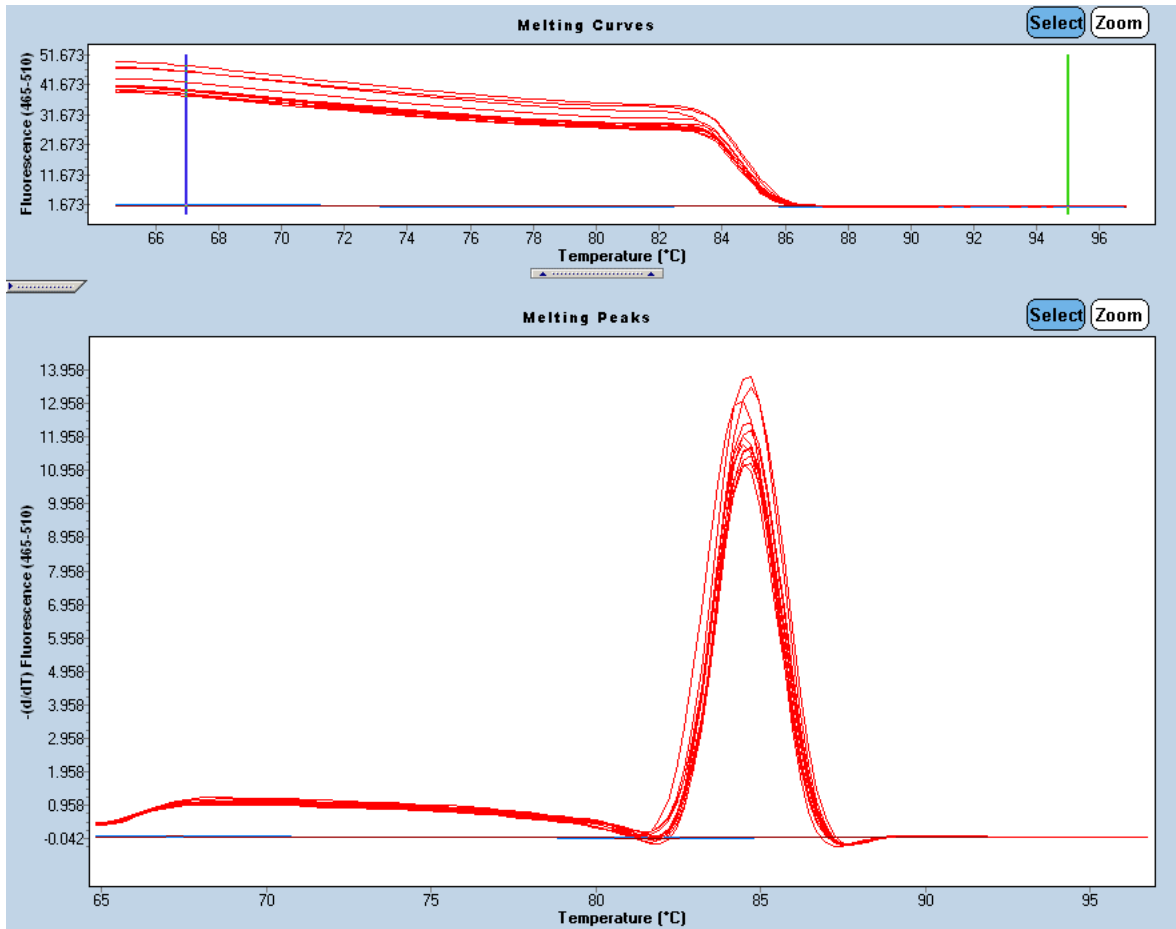


Figura 11 - Curva de Melting da qPCR com a amostra em diferentes diluições e com temperatura de melting a 57°C.

Ao analisar os gráficos e comparar as curvas, pode-se definir que a temperatura 57°C obteve o aperfeiçoamento da curva, sendo essa escolhida como temperatura de anelamento ideal da reação.

Após definir a melhor temperatura, foi realizada uma corrida com o gradiente de concentração dos *primers* (figuras 12 e 13).

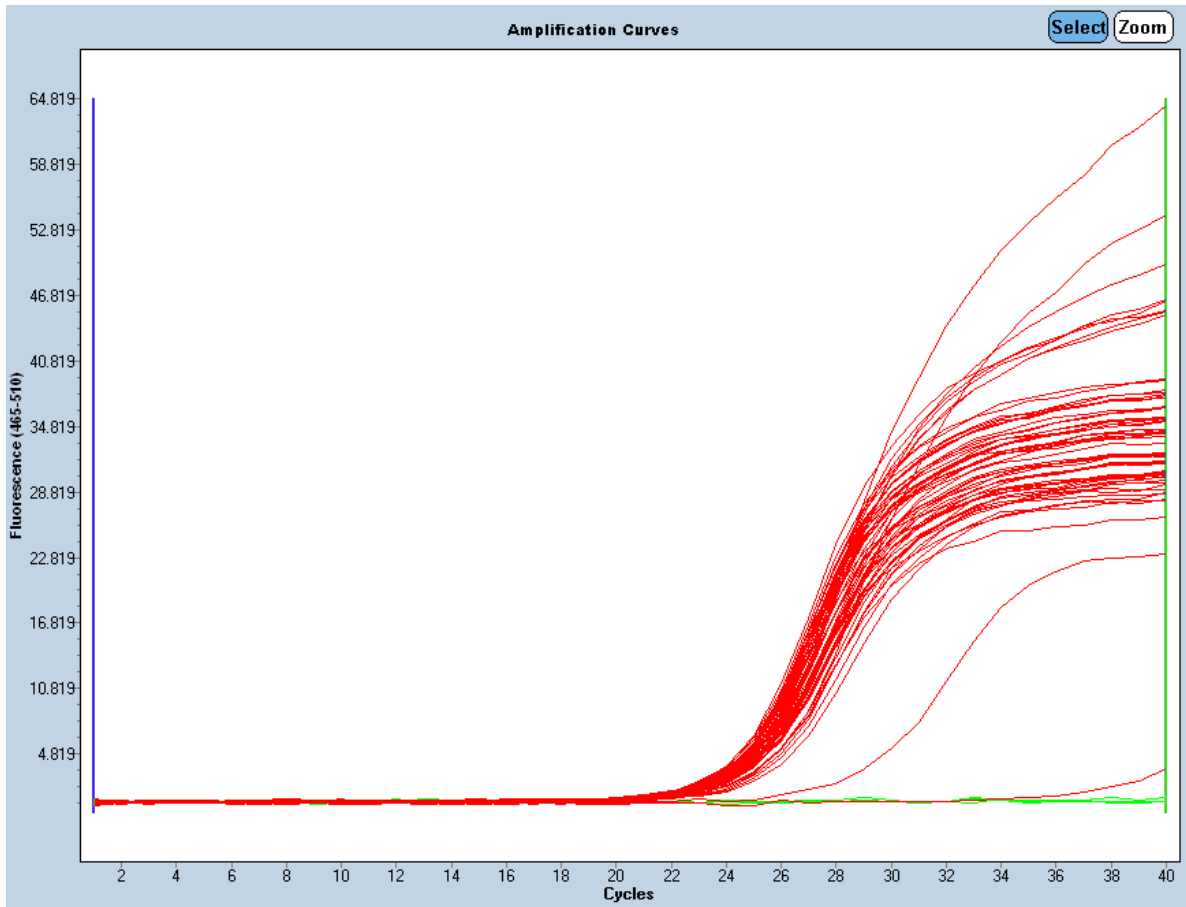


Figura 12 - Curva de amplificação do gradiente de concentração dos primers seguindo a tabela 9.

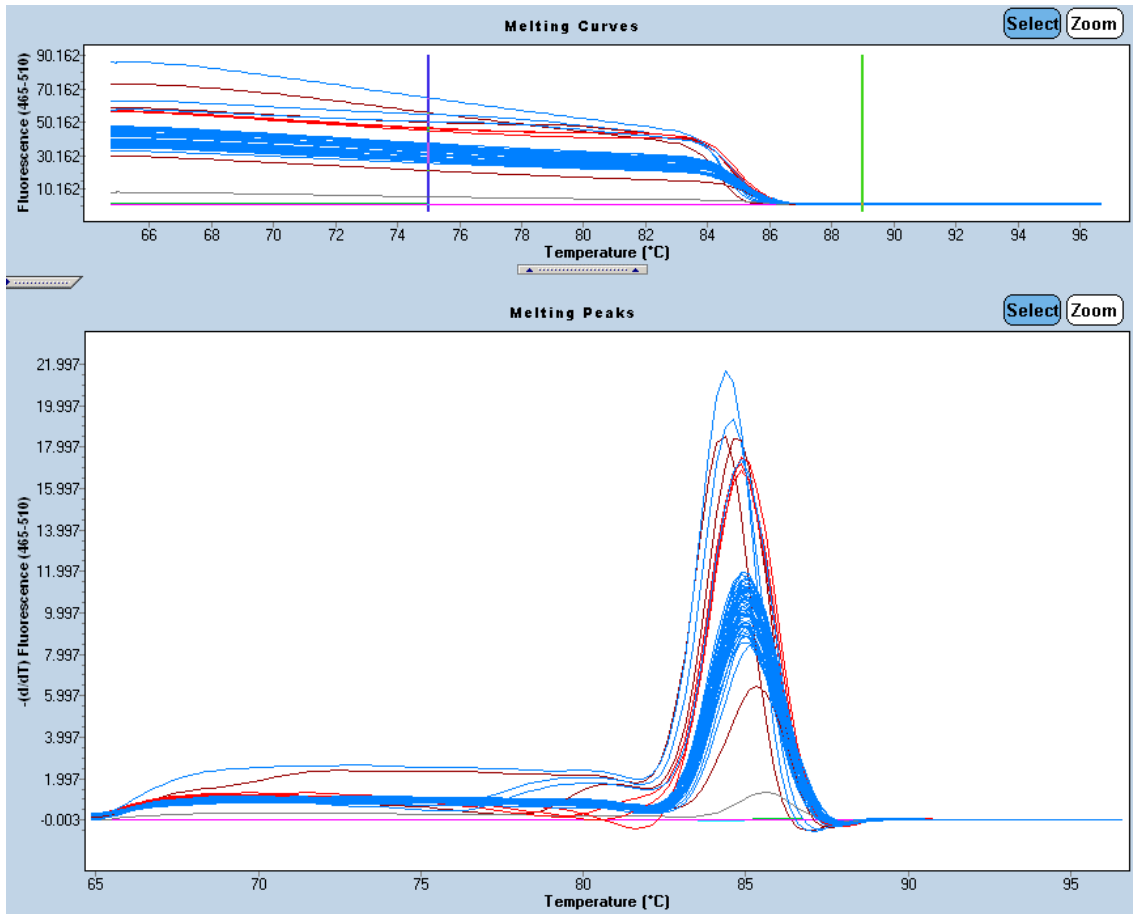


Figura 13 - Curva de Melting do gradiente de concentração dos primers.

Foi feita a repetição das concentrações de *primer* baseando-se na tabela 9 (900/200, 900/300, 900/400, 900/500, 900/600, 900/700, 900/800, 900/700, 1000/900, 1000/1000), (figuras 14 e 15).

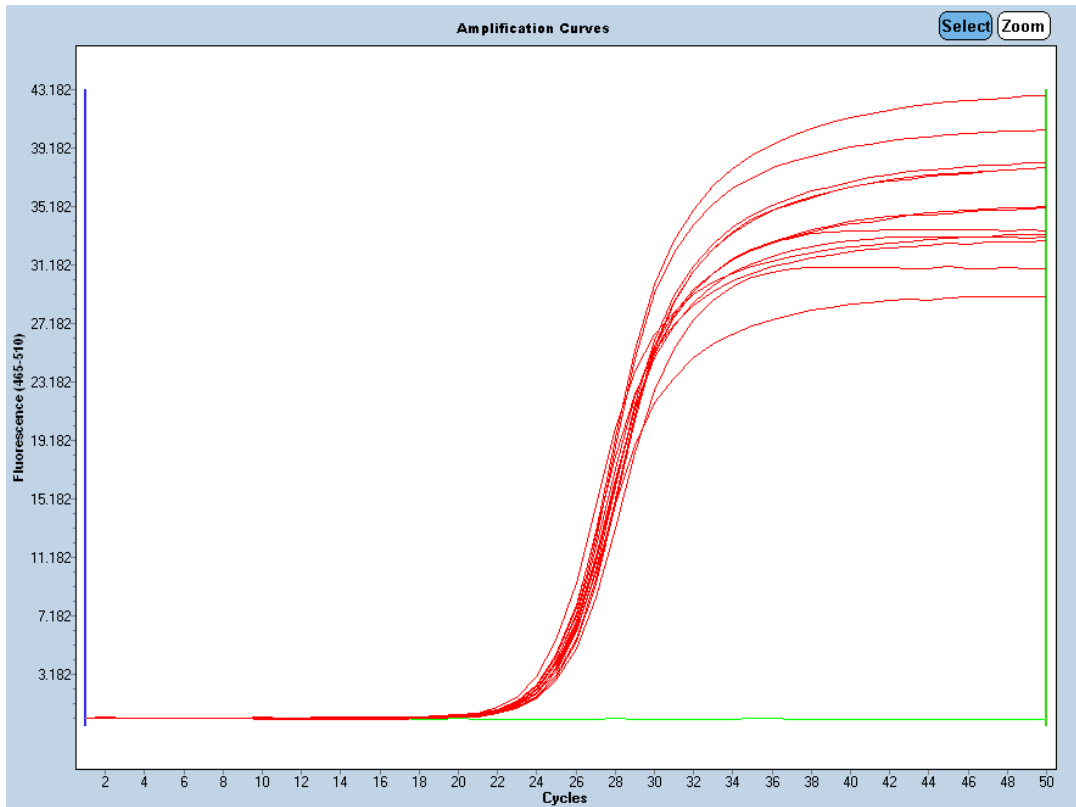


Figura 14 - Curva de amplificação seguindo diferentes concentrações de primer (900/200, 900/300, 900/400, 900/500, 900/600, 900/700, 900/800, 900/700, 1000/900, 1000/1000).

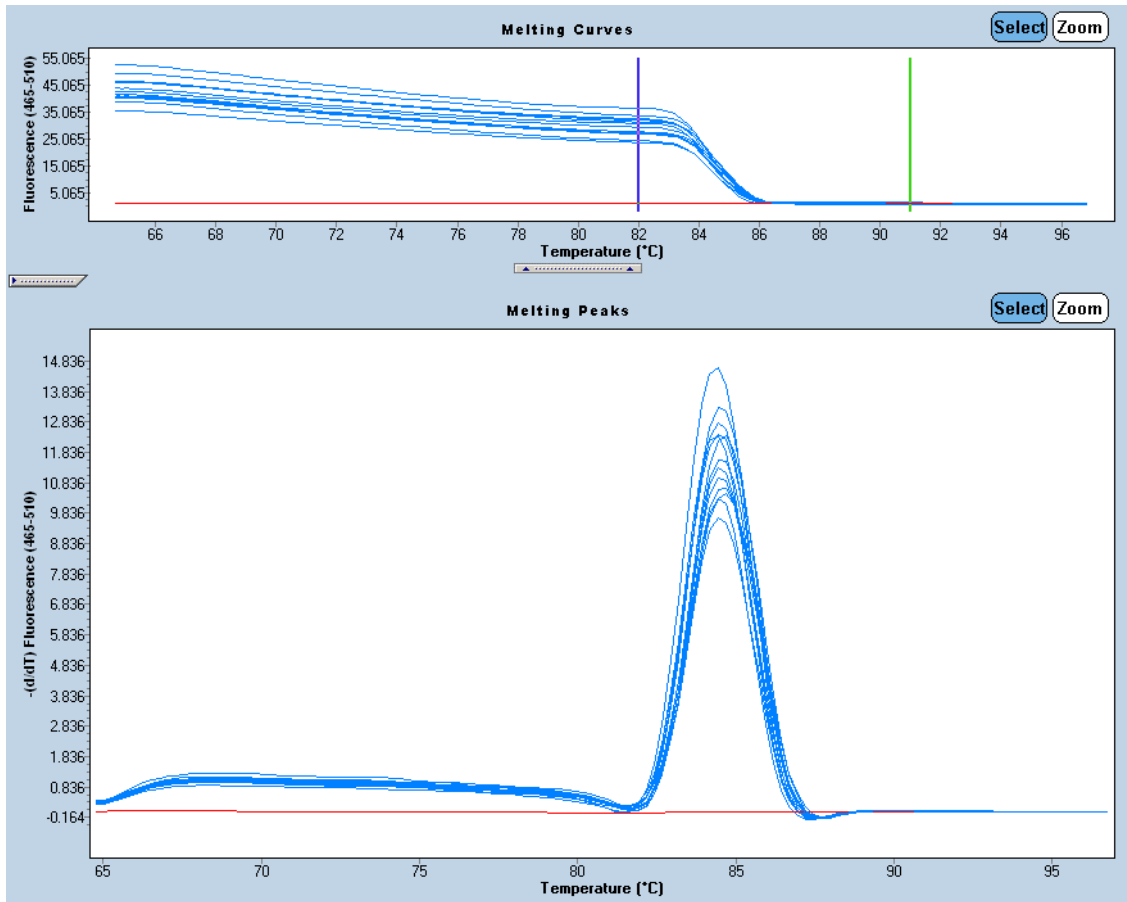


Figura 15 - Curva de Melting seguindo diferentes concentrações de primer (900/200, 900/300, 900/400, 900/500, 900/600, 900/700, 900/800, 900/700, 1000/900, 1000/1000).

Após a repetição, ao analisar as curvas, a melhor concentração de *primer* foi de 900 nM do *Foward* e 800 nM do *Reverse*.

Na figura 16 observa-se os parâmetros da reação, com as amostras em triplicata, e a figura 17 mostra que a eficiência foi de 1,9 e o Slope de -3,4 (curva padrão). Na figura 18 demonstra-se a curva de *melting*. A corrida foi repetida em três dias diferentes obtendo o mesmo resultado, comprovando a repetibilidade e reprodutibilidade do teste.

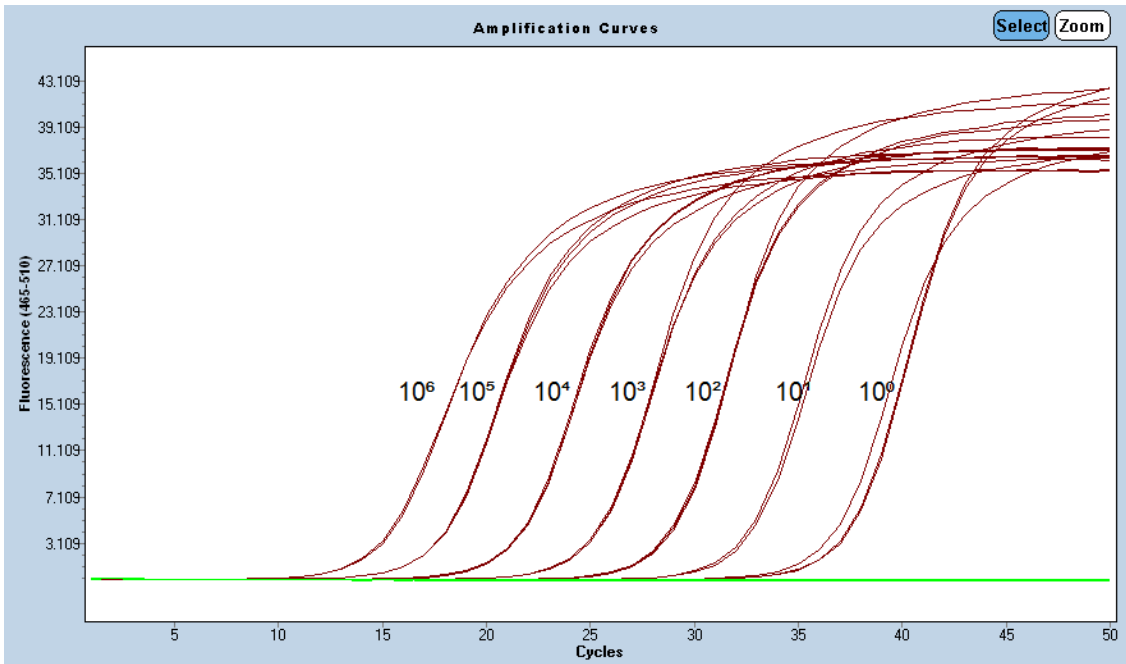


Figura 16 - Curva da qPCR do vírus purificado partindo da concentração de  $10^6$  cópias de DNA/ $\mu$ L

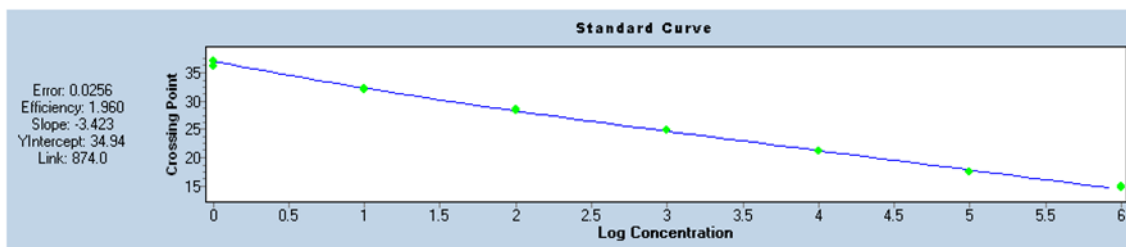


Figura 17 - Curva padrão da qPCR realizada com o sistema SYBR Green. Valores da reação: Erro = 0,025; Eficiência = 1,960; Slope = -3,423.

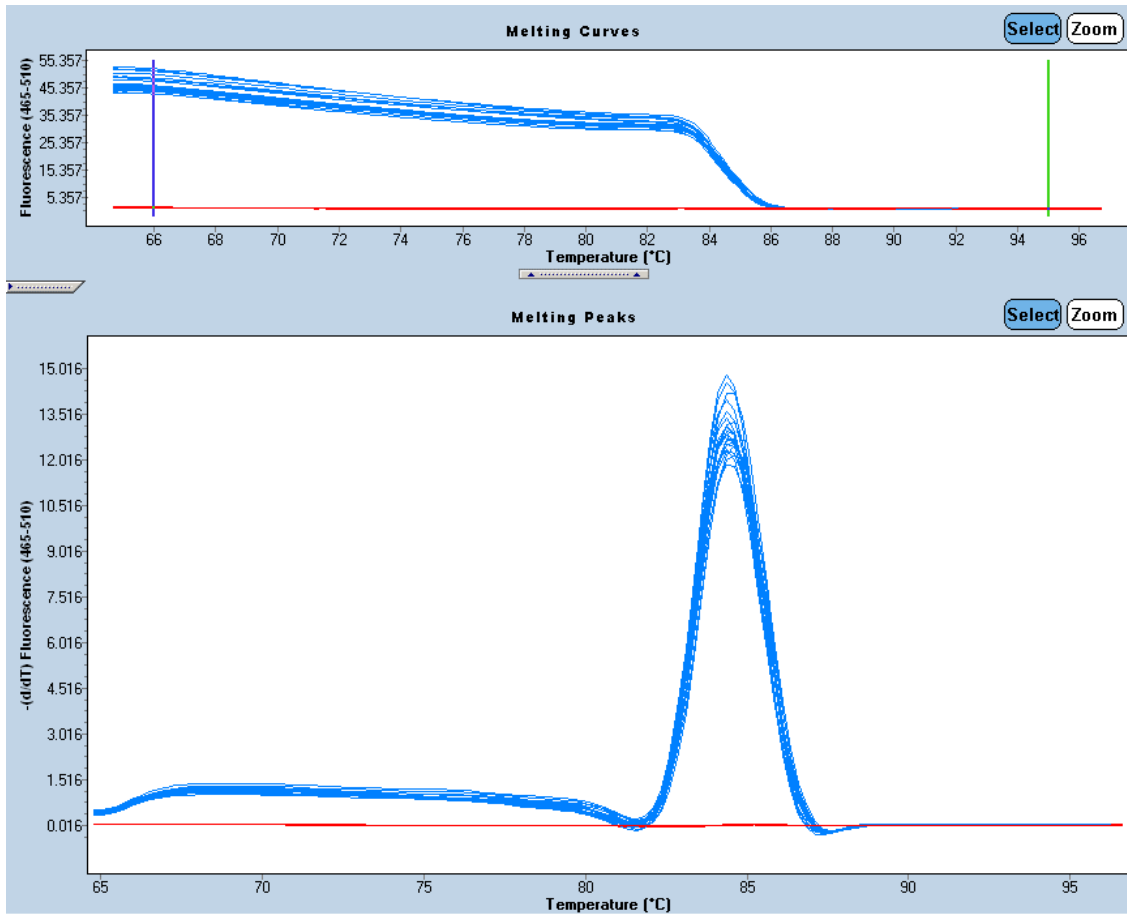


Figura 18 - Curva de Melting do purificado em diferentes concentrações, partindo da concentração de  $10^6$  cópias de DNA/ $\mu$ L

Após terem sido definidas as temperaturas e concentrações de *primer* e a otimização da sensibilidade da reação, foi realizada uma corrida com vírus padrão de outras doenças vesiculares, pPox, Pox, Varíola, FCM, BoHV-1, BoHV-5 e BoHV-2 visando comprovar a especificidade do método (figura 19)

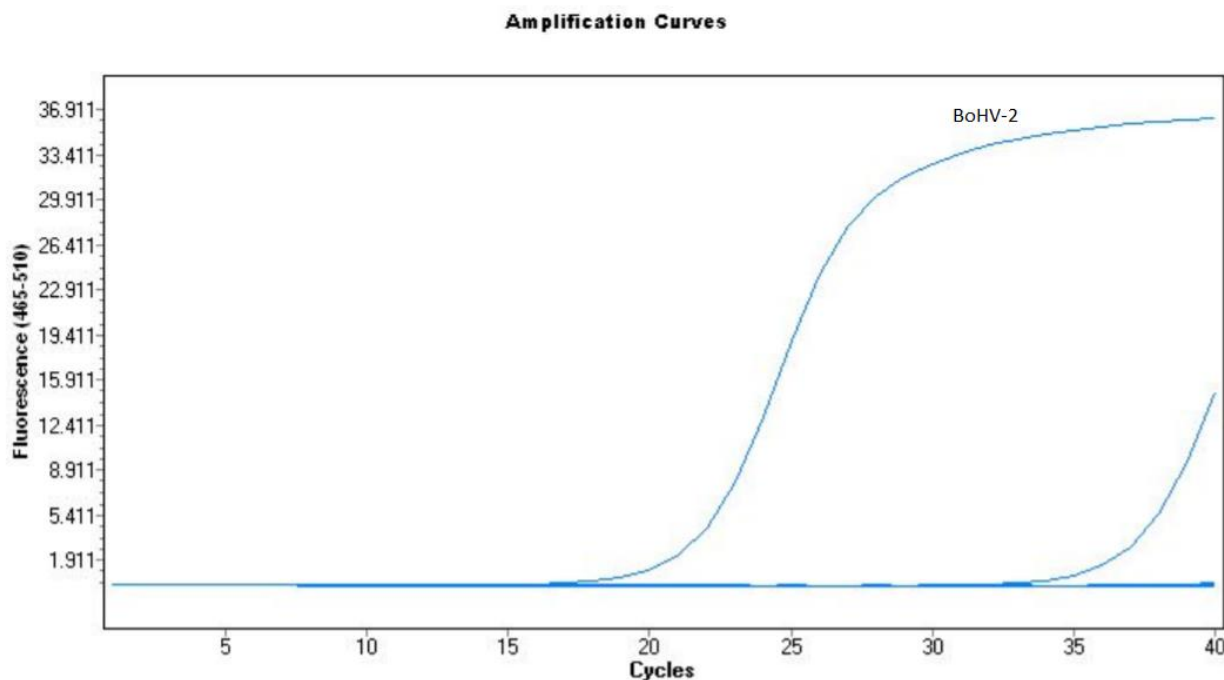


Figura 19 - Curva de Amplificação com os vírus padrão das doenças vesiculares Pox, pPox, Vaccínia, BoHV-1, BoHV-2, BoHv-5 e FCM.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram analisadas 193 amostras para BoHV-2, as quais foram testadas anteriormente para os vírus vaccínia, pPox e Ectima contagioso (orf), denso os resultados representados na tabela 10. Total de amostras 11,4%, (22/193) apresentaram resultado positivo para BoHV-2, tanto na snPCR quanto na qPCR. Destas amostras, 15 foram positivas para poxvirus (vaccínia ou pseudovariola). Os registros das amostras coletadas ao longo do período de 2010 a 2016 são apresentadas no anexo 1

Tabela 10 - porcentagem de amostras positivas para os vírus vaccínia, pseudovariola, orfe e BoHV-2.

Doença	%
Vaccínia (orthox)	45,6% (88/193)
Pseudovariola(pPox)	26,4% (51/193)
Ectima contagioso	2,1% (4/193)
BoHV-2	11,4% (22/193)
Vaccínia+pPox	7,8% (15/193)
Vaccínia+pPox+BoHV-2	7,8% (15/193)
Negativa	30,05% (58/193)
Total	100% (193)



## 5.4 SEQUENCIAMENTO

Analisando o sequenciamento realizado com os dois *mix* (tabela 6) apenas as amostras com o *mix* 2 foram sequenciadas. Observando as sequências com diferentes concentrações de *primer* (tabela 7), definiu-se a concentração de 3,5 pMol dos *primers* tanto *Forward* quanto *Reverse* para realização do sequenciamento das amostras.

As amostras analisadas pelo Blast apresentaram alta similaridade, e alta cobertura, ambas acima de 90%, comparando com os genes depositados no GenBank :

*Bovine herpesvirus type 2 glycoprotein B gene, complete cds Sequence ID: M21628.1*

*Bovine herpesvirus 2 isolate G145 glycoprotein B (UL27) gene, partial cds Sequence ID: JQ958307.1 (CAMPOS, 2014).*

*Bovine herpesvirus 2 isolate G46 glycoprotein B (UL27) gene, partial cds Sequence ID: JQ958306.1 (CAMPOS, 2014).*

*Bovine herpesvirus 1 DNA-binding protein and glycoprotein genes, partial cds Sequence ID: AH002369.2*

Todas as amostras apresentaram cobertura e similaridade apenas com esses 4 genes depositados, essas sequências somadas com às sequências do HSV-1 e 2 utilizadas por Campos (2012) e com as sequências do BoHV-1 e 5 depositadas no GenBank montou-se a árvore filogenética, comparando as amostras com os demais herpes vírus citados (figura 20).

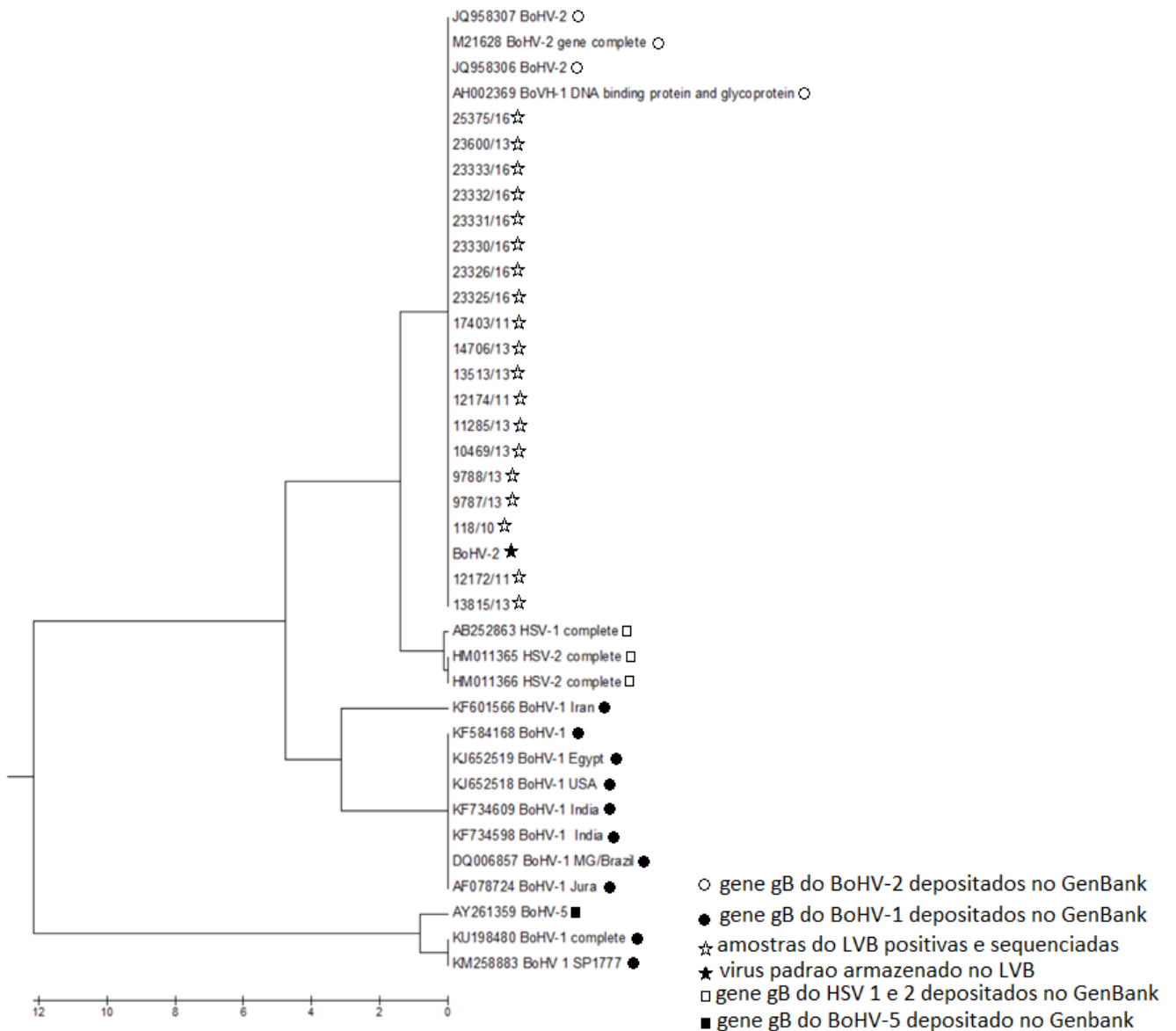


Figura 20 - Árvore Filogenética comparando as amostras sequenciadas no LVB com os genes depositados no GenBank para glicoproteína B nos vírus BoHV-1, BoHV-2, BoHV-5, HSV-1 e HSV-2 e seus respectivos números de acesso.

## 6 DISCUSSÃO

É importante gerar conhecimento sobre doenças que impactam na produção leiteira, para que medidas adequadas de controle sejam adotadas, contribuindo assim para o aumento da produtividade e crescimento dessa atividade econômica no Brasil. Nesta busca, os produtores brasileiros necessitam utilizar as vantagens competitivas do Brasil, que é importante produtor de proteína animal para enfrentar os desafios de competir com os produtores mundiais. A produção mundial de leite em 2010 foi de 695,7 bilhões de litros, onde o Brasil contribuiu com 30,7 bilhões de litros (4,42%) (VILELA, 2011). Entre 2000 e 2015, a produção de leite brasileira aumentou de 19,7 bilhões de litros de leite para 35 bilhões de litros por ano (um aumento de 77,8%), o que faz do Brasil um dos maiores produtores mundiais (BRASIL, 2017). Para garantir a produção de leite com qualidade é imprescindível seguir os protocolos oficiais de tratamentos das enfermidades dos animais, observar rigorosamente o período de carência estabelecido pelos fabricantes de medicamentos e seguir Boas Práticas de Produção, para obter animais hígidos e garantir oferta de leite saudável e de seus derivados.

Doenças vesiculares são de grande importância para o gado, pois a mastite pode acometer em média cerca de 10% das vacas por mês. Acarretam grande prejuízo como o descarte do leite, a redução de produção e o desempenho reprodutivo (MCDUGALL et al., 2016), e correspondem a 80% dos custos associados a um caso de mastite clínica (OLIVEIRA et al., 2015). Levam também o descarte prematuro do animal, resultando em perda do material genético, investimentos na compra ou na criação dos animais de reposição, o que pode ser por volta de 20% dos custos operacionais totais, lembrando que as mastites são responsáveis por cerca de 17% dos casos de descartes em rebanhos (SANTOS, 2015).

Além dos prejuízos diretos na produção leiteira, podem ocorrer prejuízos indiretos, pois as propriedades que apresentam algum tipo de doença vesicular devem ficar interdidas até o diagnóstico definitivo do agente etiológico, por conta da suspeita inicial de febre aftosa e estomatite vesicular, já que são doenças clinicamente confundíveis, a fim de evitar essas interdições, sendo necessário o diagnóstico rápido e correto dessas doenças (CARGNELUTTI et al., 2014).

A Mamilite herpética bovina (BoHV-2) causa lesões vesiculares nos tetos e na glândula mamária, conseqüentemente, afeta a qualidade e quantidade de leite produzido. Essas lesões podem ser confundidas clinicamente com a Febre Aftosa e outras doenças vesiculares, portanto seu diagnóstico rápido e correto é de extrema importância nas ações de vigilância passiva de doenças vesiculares. Se

no exame clínico não for descartada a suspeita de febre aftosa os procedimentos a serem adotados estão descritos no Plano de Ação para Febre Aftosa Volume I, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2017).

A PCR é uma ótima opção para o diagnóstico do BoHV-2, pois se padronizada adequadamente, apresenta alta especificidade, e permite ainda detectar o vírus em portadores latentes, além de ser um teste cujo resultado sai em poucas horas (NIEMCZUK et al., 2014).

Com o intuito de incluir no diagnóstico diferencial de doenças vesiculares a detecção de BoHV-2, a padronização dos ensaios snPCR e qPCR foi proposta nesta pesquisa. Há poucos estudos relacionados a detecção do BoHV-2 por métodos moleculares, mesmo assim iniciou-se o trabalho com base na literatura disponível, contudo ao reproduzir os descritos constatou-se baixa sensibilidade, portanto foi necessário aprimorar a técnica a fim de elevar a sensibilidade, eficácia e repetibilidade.

## 6.1 SEMI-NESTED PCR

A snPCR tem como objetivo melhorar a sensibilidade e a eficiência da reação, amplificando primeiramente de forma abrangente, e depois, a partir do primeiro produto, a amplificação da sequência alvo real. As duas reações são realizadas separadamente, caracterizando a snCR (VIEIRA, 2008). A técnica apresenta aumento da sensibilidade e da especificidade em relação à PCR com uma única amplificação, tendo como vantagem a diluição de inibidores da reação pela transferência do primeiro produto amplificado, porém, como desvantagem, maior tempo de execução, maior consumo de reagentes e aumenta o risco de contaminação devido ao maior número de manipulações (PERSING, 1993; REBOUÇAS, 2001). Fato constatado neste experimento, pois houve muita contaminação necessitando assim a repetição dos testes, consumindo um maior tempo.

No estudo foram avaliadas as vantagens e desvantagens de usar a snPCR para detecção do BoHV-2. A análise pela snPCR da amostra padrão de BoHV-2 reproduzindo o protocolo descrito por CAMPOS et al., (2014), resultou em baixa sensibilidade, só foi possível detectar até a diluição de  $10^5$  cópias de DNA/uL. Análise da mesma amostra após as mudanças de concentração de *primer* e de temperatura, foi possível detectar até a diluição de  $10^0$  cópias de DNA/uL, evidenciando um aumento da sensibilidade de detecção em até 100.000 vezes. Foi constatado diferença significativa no resultado quando realizada a primeira amplificação. Portanto é necessário realizar a snPCR para evitar resultados falso negativos, mesmo conscientes das desvantagens já apontadas de maior tempo para execução e mais consumo de reagentes (tabelas 2 e 3).

A especificidade foi testada, utilizando os *primers* utilizados para BoHV-2, com amostras de vírus varíola, pox, pPox, FCM, BoHV-1 e BoHV-5. Todos foram negativos indicando que não há reação cruzada com esses vírus, embora bandas inespecíficas tenham sido observadas (figura 9).

## 6.2 PCR EM TEMPO REAL

O resultado das análises em triplicata do BoHV-2 purificado pela qPCR houve 100% de concordância, bem como as amostras negativas apresentaram resultados negativos. A validação deste ensaio atendeu as expectativas, com a constatação da alta sensibilidade analítica Indicando ser esse o método de eleição para uso na rotina diagnóstica devido as suas vantagens em relação a snPCR, que são rápida execução, possui menor risco de contaminação, pouca manipulação, além disso propicia a quantificação das partículas virais. Vários estudos relatam a superioridade desta metodologia em detectar agentes virais.

A curva padrão gerada, frente às diluições do vírus, ficou dentro do padrão (*Slope* de aproximadamente -3,4, e eficiência de aproximadamente 1,9 (figura 11), melhor que o *Slope* obtido no trabalho de Herlekar et al., (2013) (figura 10), que foi de -3,09. Houve melhora da curva de *melting*, obtendo um pico único e específico após as mudanças de concentração de *primer* e temperatura, o que indica o aperfeiçoamento da técnica e sua padronização. Os resultados foram obtidos primeiro seguindo exatamente o protocolo descrito por Herlekar et al., (2013), e depois, usando as mesmas amostras, realizando-se uma corrida com a técnica aperfeiçoada, onde constatou-se melhora na eficiência e no *Slope*.

A especificidade foi testada, utilizando os *primers* utilizados para BoHV-2 e a corrida desenhada com amostras de vírus padrão do pPox, Varíola, FCM, BoHV-1 e BoHV-5 e todos deram resultados negativos como esperado. Apesar da amostra referente ao vírus da varíola ter apresentado curva, essa subiu após o ciclo 35, o que significa um resultado negativo (figura 19), além da curva de *melting* não ter formado um pico único.

Em resumo, a qPCR apresentou menor o risco de contaminação, maior rapidez de obtenção dos resultados, maior especificidade, apresentando curva em apenas uma das outras doenças vesiculares, menor custo e maior eficiência se comparada com a snPCR.

### 6.3 AMOSTRAS

As amostras positivas já haviam sido previamente testadas para outros vírus. Do total analisadas 11,4% (22/193) apresentaram o resultado positivo para o BoHV-2 nos dois ensaios snPCR e qPCR, houve 100% de concordância entre os métodos, indicando que a re-amplificação do DNA foi aumentada significativamente permitindo a sua detecção por nested. Dessas amostras positivas, 7,9% (15/22), apresentaram resultado positivo para outras doenças (vaccínia e pPox), mostrando que o BoHV-2 é um vírus ubíquo, portanto houve alta frequência de coinfeção (tabela 10), corroborando com dados descritos por Campos et al. (2014). A tabela mostra também que as infecções por vaccínia e Ppox podem ocorrer simultaneamente, pois 7,8% das amostras apresentaram resultados positivos para ambas as doenças, 7,8% apresentaram resultados positivos para os 3 agentes (Vaccínia, pPox e BoHV-2). As 3,62% (7/22) amostras que apresentaram resultado positivo apenas para BoHV-2.

### 6.4 SEQUENCIAMENTO

Foram testados dois protocolos de *mix* de amplificação de sequenciamento utilizados no LVB (tabela 6) e após a corrida de sequenciamento verificou-se que para o BoHV-2 apenas o *mix* 2 foi válido, pois nenhuma das amostras colocadas com o *mix* 1 sequenciou. Os *primers* usados foram o *Forward* e *Reverse* externo da snPCR, a concentração ideal para essa corrida foi de 3,5 pMol, diferente da snPCR que é de 10 pMol. Essa concentração foi selecionada baseando-se nas sequências obtidas com picos maiores e mais definidos. Observou-se também que com o *primer* R as sequências ficaram melhores, com picos mais elevados e definidos, isso em todas as concentrações.

Das 23 amostras colocadas no sequenciador, apenas 3 ficaram inutilizadas. As amostras sequenciadas foram colocadas no BLAST e comparadas com genes do vírus já depositados no GenBank, validando as PCRs. A árvore filogenética (figura 20) demonstrou a proximidade genética dessas 20 amostras com o próprio BoHV-2 e a distância entre os outros herpes, BoHV-1, BoHV-5, HSV-1 e HSV-2, esses últimos estando mais próximos do BoHV-2, corroborando com Roizman et al., (1992), McGeoh; Cook (1994). Segundo Torres et al. (2009b) as perspectivas de que o BoHV-2 tem a mesma origem epigenética do Simplex Humano, o que reforça a hipótese de homogeneidade de vírus na região onde apenas um tipo de vírus circulou na região no período analisado. Apesar do genoma completo do BoHV-2 ter sido sequenciado e várias sequências parciais desse vírus disponibilizadas ainda pouco se conhece do BoHV-2 no Brasil e no mundo.

## 7 CONCLUSÃO

- 1- Foi possível padronizar e validar a snPCR para BoHV-2, sendo necessário as duas ampliações, para aumentar a sensibilidade da reação e evitar resultados falsos negativos.
- 2- Foi possível validar e padronizar a qPCR para BoHV-2, com sistema do corante SYBR® Green, apresentando alta sensibilidade e especificidade, além de baixo risco de contaminação.
- 3- A reação de qPCR e snPCR possibilitaram a detecção do DNA viral de BoHV-2 e nos tecidos das lesões de tetos das vacas analisadas, sendo a mais indicada a qPCR por possuir a prova quantitativa, ser mais ágil e de menor risco de contaminação.
- 4- Na investigação da causa da mamilite constatou-se coinfeção de BoHV-2 e Poxvirus, evidenciando a necessidade de ampliação do escopo para diagnóstico de doenças vesiculares. Recomenda-se a implementação destas modernas técnicas permitindo diagnóstico diferencial cada vez mais completo e preciso, a fim de contribuir com o fortalecimento das ações de vigilância.
- 5- O sequenciamento das amostras positivas nas reações qPCR e snPCR confirmou o resultado. As sequências de nucleotídeos obtidas mostraram tratar-se de BoHV-2 e as sequências identificadas agruparam-se no grupo monofilético do BoHV-2.
- 6- O BoHV-2 é endêmico no Brasil, provocando lesões em tetos de vacas e por esse motivo deve ser incluído na lista de agentes pesquisados para confirmação do diagnóstico de doenças vesiculares a vírus, em apoio as ações do PNEFA (Programa Nacional de Erradicação de Febre Aftosa).

## 8 REFERENCIAS

ALICE, F. J. Isolamento do Vírus da mamilita herpética bovina no Brasil. **Veterinary Microbiology**, v. 8, p. 9-15, 1977.

ALMEIDA, S. R.; DIEL, D. G.; RISSI, D. R.; WEIBLEN, R.; FLORES, F. E. Caracterização clinicopatológica da mamilita aguda em ovelhas lactantes infectadas experimentalmente com o herpes vírus bovino 2. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 87- 94, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2008000100014&script=sci\\_arttext#autor](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2008000100014&script=sci_arttext#autor)>. Acesso em: 11 dez. 2014.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/leite>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

CAMPOS, F. S. Detecção de DNA de herpes vírus em gânglios trigêmeos de bovinos e avaliação de um herpes vírus bovino tipo 5 recombinante como antígeno vacinal, 2012. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/61002/000864033.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

CAMPOS, F. S.; FRANCO, A. C.; OLIVEIRA, M. T.; FIRPO, R.; STRELCHUK, G.; FONTOURA, F. E.; KULMANN, M. I. R.; MAIDANA, S.; ROMERA, S. A.; SPILKI, F. R.; SILVA, A. D.; HUBNER, S. O.; ROEHE, P. M. Detection of bovine herpes virus 2 and bovine herpes virus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 182-188, 2014.

CARGNELUTTI, J. F.; SANTOS, B. S.; LEBRE, S. DAS N.; SODRÉ, D. N. A.; SILVA, R. M.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Pseudovariola e estomatite papular em bovinos no Estado de Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*, v. 44, n. 3, p.479-485, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Leite e derivado**. Brasília: CONAB, 2016. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_04\\_12\\_14\\_04\\_46\\_leite\\_marco\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_12_14_04_46_leite_marco_2016.pdf)>. Acesso em: 29 out. 2016.

COSTA, J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología e Clínica**, v. 22, n. 55, p. 299-305, 2004.



EHLERS, B.; GOLTZ, M.; EJERCITO, M. P.; DASIKA, G. K.; LETCHWORTH, G. J. Bovine Herpesvirus Type 2 is Closely Related to the Primate Alphaherpesviruses, **Virus Genes**, v. 19, n. 3, p. 197-203, 1999.

HERLEKAR, D. A.; SHASHIKANT, C. S.; GURJAR, A. A.; JAYARAO, B. M. Presence of viral and bacterial organisms in milk and their association with somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 9, p. 6336-6346. 2013.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology** (NY), v. 11, n. 9, p. 1026-1030, 1993.

IMAI, K.; ISHIHARA, R.; NISHIMORI, T. First Demonstration of Bovine Herpesvirus 2 Infection among Cattle by Test in Japan, **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 67, cap. 3, p. 317-320. 2005.

ICTV – Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus. **Herpesvirales Study Group**. 2015. Disponível em: <[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/91/herpesviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/91/herpesviridae)>. Acesso em 24 abr. 2017.

MACKAY, I. A.; ARDEN, K. E., NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 06, p. 1292-1305. 2002.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABSTECIMENTO. Brasil lança plano para dobrar exportação de leite em 3 anos. **Portal Brasil**, 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/09/brasil-lanca-plano-para-dobrar-exportacao-de-leite-em-3-anos>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABSTECIMENTO. **Portaria DSA n. 189**, de 28 de julho de 2014, DOU 143 de 29/07/14, seção 1, p.4. Escopo de Credenciamento do Instituto Biológico.

MAPA. Programa Nacional de Erradicação de Febre Aftosa - PNEFA. Brasília – DF. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-sanitarios/programa-nacional-de-erradicacao-de-febre-aftosa-pnefa>>. Acesso em: 08 fev. 2017

MARTINS, M. S. N. **Diagnóstico molecular retrospectivo de febre catarral maligna em bovinos**. 2014. 104 f Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Programa de Pós-Graduação, Instituto Biológico, São Paulo, 2014.

MARTINS, M. S. N.; CASTRO, A. M. M. G.; LIMA, M. dos S.; PINTO, V. da S. C.; SILVA, T. G.; DEL FAVA, C.; DEPES, C. R.; OKUDA, L. H.; PITUCO, E. M. Malignant Catarrhal Fever in Brazilian cattle presenting with neurological syndrome. **Brazilian Journal of Microbiology**. 7 p. 2016.

MCDOUGALL, S.; ABBELOSS, E.; PIEPERS, S.; RAO, A. S.; ASTIZ, S.; VAN WERVEN, T.; STATHAM, J.; PÉREZ-VILLALOBOS, N. Addition of meloxicam to the treatment of clinical mastitis improves subsequent reproductive performance. **Journal of Dairy Science**. v. 99, n. 3, 2016.

MCGEOCH, D. J.; COOK, S. Molecular Phylogeny of the Alphaherpesvirinae Subfamily and a Proposed Evolutionary Timescale. **Journal of Molecular Biology**, v 238, p. 9-22, 1994.

NIEMCZUK, K.; SZYMANSKA-CZERWINSKA, M.; SMIETANKA, K.; BOCIAN, L. Comparison of diagnostic potential of serological, molecular and cell culture methods for detection of Q fever in ruminants. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 147–152, 2014.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEE, H.; BOTELHO, A. M.; MAIA, P. V.; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**.v. 121, p. 297–305, 2015.

PASSOS, T. Avaliação da condição de tetos de vacas em rebanhos leiteiros comerciais (Parte III). 2003. Disponível em: <<http://rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=693>>. Acesso em : 13 ago. 2016.

PERSING, D. Target selection and optimization of amplification reactions. In: PERSING, D.H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology – principles and applications**. Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, 1993. cap. 4, p. 88-104b.

PONCHIO, L. A.; GOMES, A. L; PAZ, E. **Perspectivas de Consumo de Leite no Brasil**. CEPEA, 2005. Disponível em: <[http://cepea.esalq.usp.br/pdf/artigo\\_leite\\_04.pdf](http://cepea.esalq.usp.br/pdf/artigo_leite_04.pdf)>. Acesso em: 13 ago. 2016.

REBOUÇAS, N. A. **Biologia molecular aplicada à medicina: fundamentos teóricos e práticos**, 1.ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 66 p. [Apostila]

REINIGER L. R.; ANTHONISEN, D.; CHOER E.; SEPEL, L. M. N. Reciclagem de agarose em laboratórios de biologia molecular. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1603- 1605, 2004.

RIET-CORREA, F.; MOOJEN, V.; ROEHE, P. M.; WEIBLEN, R. Viroses confundíveis com febre aftosa: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, n. 26, p. 323- 332, 1996.

ROIZMAN B.; DESROSIERS R. C.; FLECKENSTEIN B.; LOPEZ C.; MINSON A. C.; STUDDERT M. J. **The family Herpesviridae: an update**. Archives of Virology, v. 123, p. 425-488, 1992.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTOS, M. V. Como secar quartos mamários com mastite crônica. **Mundo do Leite**. São Paulo, p. 18 - 20, 2015.

SCOTT, F. M. M. Bovine herpesvirus 2 infection. In: WITTMANN, G. (Ed) **Herpesvirus diseases in cattle, horses, and pigs**. Boston: Kluwer Academic, 1989. p. 73-95.

STEFANO, E.; RIBEIRO, C. P.; NALI, L. H. S.; OKUDA, L. H.; VIANNA, L. C.; DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. **Detecção de Anticorpos Contra o Herpesvírus Bovino Tipo 2 (BoHV-2) em Bovinos de Corte**. Biológico, v. 68, p. 143-146, 2006. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/suplementos/v68\\_supl/p143-146.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/suplementos/v68_supl/p143-146.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2014.

TORRES, D. F.; BERNANDER, M. L.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Prevalência de anticorpos contra o vírus da mamilite herpética em bovinos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, 2009a. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782009000600043](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000600043)>. Acesso em: 11 dez. 2014.

TORRES, F. D; ALMEIDA, S. R; SILVA, M. S; WEIBLEN, R; FLORES, E. F. Distribution of latent bovine herpesvirus 2 DNA in tissues of experimentally infected sheep. **Research in Veterinary Science**, p. 161-166, 2009b.

VIEIRA, D. P. **Tutorial: Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações (Protozoologia-IMTSP/ Laboratório de Biologia Molecular-IPEN)** 2008. Disponível em: <<http://www.etail.hpg.com.br>>. Acesso em: 13 ago. 2016.

VILELA, D. Sistemas de produção de leite para diferentes regiões do Brasil. Juiz de fora. **Embrapa**, 2011. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/sistemaproducao/content/sistemas-de-produ%C3%A7%C3%A3o-de-leite-para-diferentes-regi%C3%B5es-do-brasil>>. Acesso em: 08 fev. 2017.

YUNG-SHARP, D.; KUMAR, R. Protocols for the visualisation of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. **Technique**, v. 1, n 3, p. 183-187, 1989.

## ANEXOS

*Anexo 1 - Tabela das amostras testadas, e os resultados positivos para os vírus citados.*

TA	LVB	Tipo de Amostra	Vaccínia	Pseudovariola	Orf vírus	BoHV-2
58/10	2	EPITÉLIO	x	x		
58/10	3	EPITÉLIO	x	x		
58/10	4	EPITÉLIO		x		
58/10	5	EPITÉLIO	x			
58/10	6	EPITÉLIO	x	x		
142/10	12	CROSTA	x	x		
142/10	13	CROSTA		x		
142/10	14	CROSTA		x		
142/10	15	CROSTA	x	x		
142/10	16	CROSTA	x	x		
273/10	21	CROSTA				
346/10	23	EPITÉLIO				
466/10	59	CROSTA				
466/10	60	CROSTA		x		
466/10	61	CROSTA				
466/10	62	CROSTA				
466/10	63	CROSTA		x		
626/10	64	EPITÉLIO				
626/10	65	EPITÉLIO				
626/10	66	EPITÉLIO				
627/10	67	EPITÉLIO				
627/10	68	EPITÉLIO				
791/10	73	EPITÉLIO				
791/10	74	EPITÉLIO				
791/10	75	EPITÉLIO				
791/10	76	EPITÉLIO				
791/10	77	EPITÉLIO	x			
803/10	83	EPITÉLIO	x			
984/10	88	EPITÉLIO	x			
1031/10	90	EPITÉLIO	x			

1031/10	91	EPITÉLIO				
1141/10	94	EPITÉLIO	x			
1219/10	113	CROSTA	x			
1219/10	114	CROSTA	x			
1318/10	116	EPITÉLIO	x			
1318/10	117	EPITÉLIO	x			
1391/10	118	CROSTA	x			X
1391/10	119	CROSTA	x			
1339/10	121	CROSTA	x			
1339/10	122	CROSTA	x			
1380/10	123	CROSTA	x			
1421/10	124	CROSTA	x			
1421/10	125	CROSTA				
1421/10	126	CROSTA				
1452/10	127	EPITÉLIO	x			
1453/10	128	CROSTA				
1453/10	129	CROSTA	x			
1454/10	130	CROSTA	x			
007/11	42	EPITÉLIO				
0236/11	1302	EPITÉLIO	x			
283/11	1551	EPITÉLIO		x		
452/11	2692	EPITÉLIO		x		
1041/11	10177	CROSTA				
1041/11	10178	CROSTA	x			
1041/11	10179	CROSTA	x			
1041/11	10180	CROSTA				
1041/11	10181	CROSTA	x			
1163/11	12172	CROSTA				X
1163/11	12173	CROSTA				
1163/11	12174	CROSTA				X
1471/11	17394	SUABE		x		
1471/11	17403	SUABE		x		X
1471/11	17405	SUABE		x		

1471/11	17406	SUABE	x			
1471/11	17407	SUABE	x	x		
1471/11	17408	SUABE	x			
1874/11	21767	CROSTA	x			
1874/11	21768	CROSTA				
1874/11	21769	CROSTA				
1940/11	21973	CROSTA	x			
2016/11	22867	CROSTA	x			
2016/11	22868	CROSTA	x			
2016/11	22869	CROSTA	x			
2782/11	34091	CROSTA	x			
2782/11	34092	SUABE				
2782/11	34093	SUABE				
1564/12	19284	CROSTA				
2440/12	27173	CROSTA	x			
2440/12	27174	CROSTA	x	x		
2440/12	27175	MACERADO	x	x		
2442/12	27230	CROSTA	x			
2442/12	27231	CROSTA				
844/12	9585	CROSTA	x			
844/12	9586	CROSTA	x			
844/12	9587	CROSTA	x			X
844/12	9588	CROSTA				X
844/12	9589	CROSTA	x			
844/12	9590	CROSTA	x			
953/13	10469	CROSTA				X
1092/13	13593	CROSTA	x	x		X
1156/13	13815	SORO				X
1281/13	14930	CROSTA	x			
1281/13	14931	CROSTA	x			
1281/13	14932	CROSTA	x			
1281/13	14933	CROSTA	x			
1281/13	14934	CROSTA	x			

1482/13	17814	CROSTA	x			
1541/13	18824	EPITÉLIO				
1598/13	19801	EPITÉLIO				
1910/13	22098	CROSTA	x			
1910/13	22099	CROSTA	x			
1910/13	22100	CROSTA	x			
1910/13	22101	CROSTA	x			
1910/13	22102	CROSTA	x			
1910/13	22103	CROSTA	x			
2099/13	23600	CROSTA	x	x		X
2123/13	23662	CROSTA	x			
2253/13	25324	CROSTA	x			
2268/13	25325	CROSTA	x			
2476/13	30045	CROSTA				
2476/13	30046	CROSTA				
135/14	1886	CROSTA	x			
135/14	1887	CROSTA	x			
135/14	1888	CROSTA	x			
135/14	1889	CROSTA	x			
135/14	1890	CROSTA	x			
135/14	1891	CROSTA	x			
135/14	1892	CROSTA	x			
135/14	1893	CROSTA	x			
135/14	1894	CROSTA	x			
135/14	1895	CROSTA	x			
253/14	2488	CROSTA	x			
253/14	2489	CROSTA	x			
253/14	2490	CROSTA	x			
253/14	2491	SUABE	x			
636/14	5248	CROSTA	x			
108/15	167	SUABE				
661/15	2615	CROSTA		x		
661/15	2616	CROSTA				

661/15	2617	CROSTA		x		
661/15	2618	CROSTA		x		
746/15	2939	CROSTA		x		
746/15	2940	CROSTA		x		
746/15	2941	CROSTA		x		
746/15	2942	CROSTA		x		
746/15	2943	CROSTA		x		
747/15	2945	CROSTA		x		
791/15	3121	CROSTA		x		
827/15	3575	CROSTA		x		
875/15	3770	CROSTA			x	
875/15	3771	CROSTA				
875/15	3772	CROSTA			x	
875/15	3778	SUABE			x	
875/15	3779	SUABE			x	
1102/15	5828	CROSTA				
1365/15	8154	SUABE		x		
1779/15	11277	SUABE				
1780/15	11282	CROSTA		x		
1780/15	11283	CROSTA				
1780/15	11284	CROSTA				
1780/15	11285	CROSTA		x		X
1908/15	12476	CROSTA		x		
1908/15	12477	CROSTA		x		
1908/15	12478	CROSTA		x		
2154/15	14705	CROSTA				
2154/15	14706	CROSTA	x			X
2154/15	14707	CROSTA	x			
2206/15	15367	CROSTA	x			
2541/15	18040	CROSTA		x		
2541/15	18041	CROSTA				
2541/15	18043	CROSTA				
2541/15	18044	CROSTA				



2541/15	18045	CROSTA				
2541/15	18046	CROSTA		x		
2541/15	18047	CROSTA				
268/16	4996	CROSTA		x		
268/16	4997	CROSTA		x		
268/16	4998	CROSTA		x		
268/16	4999	CROSTA		x		
270/16	5006	SORO				
338/16	5284	EPITÉLIO				
820/16	18042	SORO				
904/16	19546	SUABE				
904/16	19547	CROSTA		x		
1204/16	21530	SUABE				
1204/16	21531	SUABE				
1204/16	21532	SUABE				
1204/16	21533	SUABE				
1204/16	21534	CROSTA				
1204/16	21535	CROSTA				
1204/16	21536	CROSTA				
1204/16	21537	CROSTA				
1546/16	23325	CROSTA	x			x
1546/16	23326	CROSTA	x			x
1546/16	23327	CROSTA		x		x
1546/16	23328	CROSTA				
1546/16	23329	CROSTA	x	x		x
1546/16	23330	CROSTA		x		x
1546/16	23331	CROSTA	x	x		x
1546/16	23332	CROSTA	x	x		x
1546/16	23333	CROSTA	x	x		x
1928/16	25375	CROSTA				x
1928/16	25378	CROSTA				x

## Anexo 2 - Certificado do CETEA-IB frente e verso



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO BIOLÓGICO

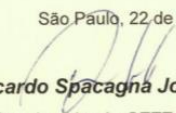
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 56/08** sobre o Projeto: “**Diagnóstico laboratorial de enfermidade provocada pelo Herpesvírus Bovino tipo 2 (BoHV-2) em amostras provenientes de animais suspeitos, encaminhadas ao serviço de rotina diagnóstica do LVB do Instituto Biológico/APTA**”, sob a responsabilidade de **Edviges Maristela Pituco**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA).

Protocolo inicialmente aprovado pela *CETEA-IB* em 25 de julho de 2008 e renovado em 28 de julho de 2010 e em 22 de agosto de 2012.

São Paulo, 22 de agosto de 2012

  
**Ricardo Spacagna Jordão**  
Coordenador da *CETEA-IB*

**CETEA - IB****Registro**

Número : 56/08

Livro : 01

Folha : 56

Data: 22/08/12