



**DIAGNÓSTICO MOLECULAR RETROSPECTIVO DE
FEBRE CATARRAL MALIGNA EM BOVINOS**

MAIRA DE SOUZA NUNES MARTINS

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

2014

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR RETROSPECTIVO DE FEBRE CATARRAL MALIGNA EM BOVINOS

MAIRA DE SOUZA NUNES MARTINS

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

2014

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

Martins, Maira de Souza Nunes.

Diagnóstico molecular retrospectivo de febre catarral maligna em bovinos. /
Maira de Souza Nunes Martins. -- São Paulo, 2014.
104 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: Retrospective molecular diagnostic malignant
catarrhal fever in cattle.

1. OvHV-2 2. PCR qualitativa 3. PCR quantitativa 4. Síndrome neurológica
5. Padronização I. Martins, Maira de Souza Nunes II. Pituco, Edviges Maristela
III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2014/012



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo – SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Maira de Souza Nunes Martins

**Título: DIAGNÓSTICO MOLECULAR RETROSPECTIVO DE FEBRE CATARRAL
MALIGNA EM BOVINOS**

Orientadora: Profa. Dra. Edviges Maristela Pituco

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da 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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Profª Drª: Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Profª Drª: Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro

Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura:

Profº Dr: Fábio Gregori

Instituição: Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Magda, quem me deu a vida, me mostrou e me ensinou todas as faces desta, quem esteve e está sempre do meu lado, meu porto seguro e exemplo de vida. Pessoa maravilhosa a qual tenho o privilégio de chamar de mãe e saber o verdadeiro significado disso. Mãe, eu te amo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por sempre me guiar e me mostrar, mesmo nos momentos mais desesperadores e difíceis, o significado e o ensinamento do episódio e assim, pela fé, sempre seguir em frente.

À minha mãe, **Magda**, pelo amor, carinho, dedicação, compreensão, apoio, por sempre estar do meu lado em todos os momentos da minha vida e por nunca desistir de mim.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. **Edviges Maristela Pituco**, pela confiança, pela oportunidade dada e colaboração, não só na realização deste trabalho, como também no meu crescimento profissional.

À Prof^a. Dra. **Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro**, Jovem Pesquisadora junto ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, membro da banca examinadora, por toda ajuda, pela paciência, pelo incentivo, por sempre estar disponível quando requisitada por mim, por todos os ensinamentos, por sempre me mostrar e instigar os caminhos científicos, pela orientação, pelas ideias dadas, por sempre me motivar, pelas conversas amigáveis e por compartilhar seu vasto conhecimento comigo. Exemplo de profissionalismo e pessoa.

Ao Prof. Dr. **Fábio Gregori**, departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, membro da banca examinadora, pelas sugestões dadas.

À Prof^a. Dra. **Cláudia Del Fava**, pesquisadora do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico, membro suplente da banca examinadora, pelas ideias dadas, por abrir as portas do seu laboratório para mim, pela ajuda, pelos conselhos dados, por me integrar ao mundo da histologia e por fazer parte na construção e desenvolvimento desde trabalho.

À Dra. **Elenice Maria Sequetin Cunha** pesquisadora do Laboratório de Raiva e Encefalites Virais do Instituto Biológico, membro suplente da banca.

Às minhas companheiras de pesquisa e grandes amigas **Michele, Thaís e Vívian** por tudo que fizeram e fazem por mim, pelo companheirismo, apoio, ensinamentos tanto profissionais como pessoais, pelas risadas, por estarem sempre do meu lado, pela adorável convivência. Pessoas iluminadas que vou levar no meu coração pelo resto de minha vida.

À minha grande amiga, confidente e parceira **Adriana Paulini**, por sempre estar disposta a me ajudar, por sempre me ouvir, por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntas. Ensinou-me a ver a vida com outros olhos e deu rumo as minhas perturbações, ofereceu-me seu ombro amigo, sem pedir nada, simplesmente minha amizade. Presente que Deus colocou em minha vida.

À pesquisadora **Eliana De Stefano**, por permitir o meu ingresso no Instituto Biológico e na vida científica, me dando a oportunidade e orientação nas iniciações científicas, mesmo não conhecendo a minha pessoa inicialmente.

Às pesquisadoras **Liria Hiromi Okuda** e **Adriana Nogueira**, pela ajuda, pelos ensinamentos e por contribuir, mesmo que indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do LVB, **Alisete, Claudia, Márcia, Raquel, Simone** e **Marta** pela convivência diária, de alguma maneira estiveram e contribuíram com alguma etapa do desenvolvimento deste trabalho e pela disponibilidade quando precisei de ajuda.

À Dra. **Maria Luana Cristiny** da Universidade Federal da Paraíba, pela contribuição com as amostras cedidas.

Ao **Instituto Biológico e Pós-Graduação**, funcionários, professores e colegas de curso pela contribuição ao meu crescimento profissional.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior) pela bolsa concedida e apoio financeiro.

EPÍGRAFE

“O mais competente não discute, domina a sua ciência e cala-se.”

Voltaire

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar uma coisa diferente”.

Roger Von Oech

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

MARTINS, M. S. N.- DIAGNÓSTICO MOLECULAR RETROSPECTIVO DE FEBRE CATARRAL MALIGNA EM BOVINOS. São Paulo. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Febre Catarral Maligna (FCM) doença viral aguda, pansistêmica, de distribuição geográfica ampla, geralmente fatal, afeta principalmente bovinos e cervídeos. São conhecidas dez espécies de vírus do grupo da FCM, todos *Herpesvirus*, família *Gammaherpesvirinae*, gênero *Macavirus*. A principal no Brasil é FCM ovino-associada, induzida pela cepa herpesvírus ovino-2 (OvHV-2). Por ser confundível com encefalites/encefalopatias e febre aftosa, há a necessidade do diagnóstico diferencial, sendo que os métodos moleculares permitem, em tempo oportuno, identificar os focos e avaliar a situação epidemiológica desta doença no Brasil. Contudo, esses ainda não estão disponíveis na rotina laboratorial para detectar o agente causador da FCM. Por esse motivo, objetivou-se avaliar métodos de extração tanto para material *in natura* como parafinado; padronizar e validar métodos moleculares de diagnóstico (PCR qualitativa e quantitativa) para o OvHV-2, realizar a análise retrospectiva de amostras de sistema nervoso central de bovino do Brasil e isolar o OvHV-2 em cultura celular. Foram avaliados três protocolos de extração de material *in natura*, cinco kits comerciais e dois protocolos recomendados pela literatura para extração de material embocado em parafina. Realizou-se a análise retrospectiva de 290 amostras de sistema nervoso central de bovinos, com diagnóstico clínico de transtorno neurológico, avaliado seguindo critérios clínicos definidos no formulário síndrome neurológica (FORM SN), sendo que as mesmas amostras encontravam-se *in natura* e embocadas em parafina. O Trizol[®] foi o protocolo mais eficiente para a extração de material *in natura*, pois apresentou reprodutibilidade e repetibilidade. Para material parafinado a extração mais efetiva utilizou o xilol aquecido a 65°C para desparafinização, digestão enzimática com o detergente SDS combinado com a proteinase K, purificação por fenol/clorofórmio e precipitação em isopropanol, porém este método não apresentou

reprodutibilidade. A sensibilidade da PCR qualitativa para OvHV-2 foi de 10^1 cópias de DNA/ μ L e da qPCR de 10^0 cópias de DNA/ μ L, tanto sistema SYBR[®]Green como TaqMan[®]. Das 290 amostras de SNC analisadas, 4,8% (14/290) foram positivas na PCR qualitativa e 5,86% (17/290) na qPCR, a discordância da porcentagem de positividade é, possivelmente, devido a diferença de sensibilidade entre as técnicas. Foram confrontados os resultados da PCR e histopatológico sendo que 47,05% (8/17) apresentaram lesões e alterações histológicas sugestivas de FCM (infiltrado inflamatório mononuclear e manguito perivascular mononuclear). Não obteve-se sucesso no isolamento do OvHV-2 em cultura de células MDBK. O limiar de detecção das técnicas moleculares foi satisfatório, portanto indicadas na rotina laboratorial. No sequenciamento e análise filogenética das amostras positivas, verificou-se tratar-se de OvHV-2 semelhante aos circulantes no mundo. Os achados confirmam a necessidade de provas de diagnóstico específicas e sensíveis para identificação do agente da FCM nos casos de transtornos nervosos, já que não houve concordância entre os achados histopatológicos e moleculares, levando a resultados falso-negativos quando é realizada apenas a análise histológica. Baseado nesse conhecimento será possível fazer a vigilância sanitária efetiva e evitar as consequências socioeconômicas, contribuindo assim para oferta sustentável de alimentos suficiente.

Palavras-chave: OvHV-2, PCR qualitativa, PCR quantitativa, síndrome neurológica, padronização.

ABSTRACT

MARTINS, M. S. N- RETROSPECTIVE MOLECULAR DIAGNOSTIC MALIGNANT CATARRHAL FEVER IN CATTLE. São Paulo. 2014. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Malignant catarrhal fever (MCF), viral disease, acute, affects multiple systems, wide geographical distribution, usually fatal, affects mainly cattle and deer. Ten species of viruses belonging to the FCM group are known, all *Herpesvirus*, Family *Gammaherpesvirinae*, genus *Macavirus*. The main in Brazil is the MCF sheep-associated, induced by strain ovine herpesvirus 2 (OvHV-2). For being confusingly with encephalitis/encephalopathy and foot and mouth disease there is the need for differential diagnosis, and molecular methods allow timely identification of outbreaks and assess the epidemiological situation of the disease in Brazil. However, these are not yet routinely available in laboratories to detect the causative agent of MCF. Therefore, the objective was to evaluate methods extraction for materials *in natura* and paraffin embedded tissue; standardize and validate molecular methods diagnostic (qualitative and quantitative PCR) for OvHV-2, perform retrospective analysis of samples of the central nervous system of cattle from Brazil and isolate OvHV-2 in cell culture. Were evaluated three protocols for extraction of material *in natura*, five commercial kits and two protocols recommended in the literature for extraction paraffin embedded tissue. Performed retrospective analysis of 290 samples of bovine central nervous system, with clinical diagnosis of neurological disorder, assessed following clinical criteria defined in Form neurological syndrome (FORM SN), and the same samples were *in natura* and embedded in paraffin. The Trizol® was the most efficient protocol for the extraction of material *in natura*, it showed reproducibility and repeatability. For the paraffin embedded tissue, the most effective extraction used the heated xylene at 65 °C for desparaffinization, enzymatic digestion combined with the detergent SDS with proteinase K, purified by phenol/chloroform and precipitation in isopropanol, but this method did not show reproducibility. The sensitivity of a qualitative PCR to OvHV-2 was 10¹ copies of DNA /μL and qPCR of the 10⁰ copies of

DNA/ μ L , both SYBR® Green and Taq®Man system. Of the 290 samples CNS analyzed, 4,8% (14/290) were positive in the qualitative PCR and 5,86% (17/290) in the qPCR, the discrepancy in the percentage of positivity is possibly due to the difference in sensitivity between technical. The PCR results were compared with histopathologic and that 47,05% (8/17) had lesions and histological changes suggestive of MCF (mononuclear inflammatory infiltrate and perivascular mononuclear). No was obtained success in isolation OvHV-2 in cultured MDBK. The threshold detection of molecular techniques has been satisfactory thus indicated for routine laboratory. In the sequencing and phylogenetic analysis of the positive samples, it was found that it was similar to OvHV-2 circulating worldwide. The findings confirm the need for evidence of specific and sensitive diagnostic for identifying the agent of MCF in cases of nervous disorders, since there was no correlation between the histopathological and molecular findings, leading to false negative results when it is performed only histological analysis. Based on this knowledge it will be possible to make surveillance effective and avoid socioeconomic consequences, thereby contributing to offer sustainable of sufficient food.

Keywords: OvHV-2, qualitative PCR, quantitative PCR, neurological syndrome, standardization.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Concentração de agarose indicada para separação dos fragmentos de DNA.	19
Quadro 2 Open reading frames (ORFs) codificados pelo OvHV-2 (BJ1035) e suas respectivas funções (HART et al., 2007)	26
Quadro 3 Sequência dos <i>primers</i> da PCR qualitativa e localização da região de hibridação. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência do GenBank (n. acesso DQ198083.1)	42
Quadro 4 Condições de ciclagem e temperatura da primeira amplificação da PCR qualitativa.....	42
Quadro 5 Condições de ciclagem e temperatura da segunda amplificação da PCR qualitativa.....	43
Quadro 6 Sequência dos <i>primers</i> , localização da região de hibridação e tamanho do amplificado. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência do GenBank (n. acesso DQ198083.1)	44
Quadro 7 Condições de ciclagem e temperatura de amplificação pelo sistema SYBR® Green.....	45
Quadro 8 Condições de ciclagem e temperatura de amplificação pelo sistema TaqMan. ...	47
Quadro 9 Condição de ciclagem e temperatura para reação de sequenciamento.....	50
Quadro 10 Sequências referências obtidas no GenBank para análise filogenética do OvHV-2.....	51
Quadro 11 Sequência, localização da região de hibridação e tamanho do amplificado dos <i>primers</i> utilizados na PCR do controle interno do gene da β - actina.	52
Quadro 12 Amostras e as respectivas posições dos códon onde foram observadas substituições de nucleotídeos (negrito e sublinhado) e aminoácidos dentre as 13 amostras sequenciadas.	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** A: opacidade da córnea; B: fígado hemorrágico; C: pequenas manchas brancas no rim; D Superfície da mucosa do abomaso com ulcerações necrosupurativea(setas) com exsudato amarelo-esverdeados. Fonte: Cardoso et al., 2009. 12
- Figura 2** Erosão na mucosa vesical (esquerda) e mucosa vesical (direita). Fonte: Dr. Claudio Depes 12
- Figura 3** Esquema da organização do genoma do OvHV-2 BJ1035. ORFs estão representados por setas largas no sentido da transcrição/tradução. DNA não codificante como uma linha sólida. Os ORFs estão em escala relativas abaixo em kpb. Sítios de *Splice* é demonstrado como linhas acima conectando os éxons. Potenciais sinais de poliadenilação (AATAAA e ATATAA) está representado por setas apontadas para baixo (*forward*) ou para cima (*reverse*) .(HART et al, 2007). 25
- Figura 4** Comparação da organização do genoma do OvHV-2 (acima) e AIHV-2 (abaixo). ORFs são representados por setas largas da seguinte forma: sombreado de cinza estão os ORFs comuns a herpesvirus, sem sobreamento ORFs encontrados apenas em OvHV-2 e AIHV-2, sombreado preto ORFs exclusivos para OvHV-2 ou AIHV-2 (HART et al., 2007). 29
- Figura 5** Gel de agarose mostrando a eficiência dos protocolos de extração do material *in natura*. 54
- Figura 6** Gel de agarose mostrando a eficiência da extração dos kits para o material parafinado (NucleoSpin® FFPE DNA (Macharey- Nagel), Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (STRATEC Molecular), innuPREP® DNA Mini Kit (Analytik Jena)), seguidos pelo controle positivo com a altura específica e esperada (422 pb). 55
- Figura 7** Gel de agarose mostrando a eficiência da extração QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (em 1) seguido pelo controle positivo (em 3) com a altura específica e esperada (422 pb) e branco (em 4). 56
- Figura 8** Gel de agarose da eficiência de extração do protocolo recomendado por Chan et al. (2001) de diversas partes do sistema nervoso central de uma amostra sabidamente positiva (poços 1 a 9) seguida do controle positivo (poço 10) e negativo (poço 11) com altura esperada de 422 pb. 56
- Figura 9** Gel agarose da extração feita segundo Nascimento et al. (2003) observando-se arrasto (poços 1 a 4) seguidas de dois controles positivos (5 e 6) na altura esperada de 422 pb. 57

- Figura 10** Alinhamento da amostra sequenciada e genoma completo de OvHV-2 (HART et al., 2007) e Strain BJ1035 (BAXTER et al., 1993)..... 59
- Figura 11** Gel do gradiente de temperatura da PCR qualitativa da primeira e segunda amplificação..... 62
- Figura 12** Gel do gradiente de temperatura da 2ª amplificação da PCR qualitativa sendo que a 1ª amplificação foi feita a 60°C..... 62
- Figura 13** Gel de agarose indicando o limiar de detecção das diluições do vírus padrão em *Nuclease-free water* com a altura esperada de 238 pb específico. 63
- Figura 14** Gel de agarose indicando o limiar de detecção das diluições do vírus padrão em extraído de SNC bovino sabidamente negativo com a altura esperada de 422 e 238 pb específico..... 64
- Figura 15** Gel do gradiente de 65°C a 70°C utilizando as diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do 10^4 a 10^1 65
- Figura 16** Gel de agarose indicando o limiar de detecção das diluições do vírus padrão em extraído de SNC bovino sabidamente negativo com a altura esperada de 238pb específico utilizando os *primers* 556 e 555..... 65
- Figura 17** Curva da melhor concentração dos *primers forward* e *reverse*- Sistema SYBR®Green..... 66
- Figura 18** Curva padrão realizada com o sistema SYBR® Green, diluições em *Nuclease Free Water* 10^5 a 10^0 . Valores da reação: Erro =0,0338 ; Eficiência = 1,990 ; *Slope*= -3,346..... 67
- Figura 19** Curva de *Melting* realizada com o sistema SYBR® Green, diluições em *Nuclease Free Water* 10^5 a 10^0 com pico de *Tm* de 86 °C. 68
- Figura 20** Curva padrão realizada com o sistema SYBR® Green, diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 10^5 a 10^0 . Valores da reação: Erro =0,0108; Eficiência = 2,001; *Slope*= -3,319..... 69
- Figura 21** Curva de *Melting* realizada com o sistema SYBR® Green, diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 10^5 a 10^0 com pico de *Tm* de 86 °C..... 70
- Figura 22** Curva da melhor concentração dos *primers forward* e *reverse* (500/500nM) e *probe* (90nM)- Sistema TaqMan®. 71

- Figura 23** Curva padrão realizada com o sistema TaqMan® , diluições em *Nuclease Free Water* 10^5 a 10^0 . Valores da reação: Erro =0,0907 ; Eficiência = 1,979 ; *Slope*= -3,373..... 72
- Figura 24** Curva padrão realizada com o sistema TaqMan®, diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 10^5 a 10^0 . Valores da reação: Erro =0,0723; Eficiência = 1,994; *Slope*= -3.336..... 73
- Figura 25** Rede admirável carotídea com moderado infiltrado inflamatório mononuclear na túnica adventícia (HE, aumento 200X) 77
- Figura 26** Córtex cerebral com discreto infiltrado mononuclear meníngeo (HE, aumento 200X) 77
- Figura 27** Córtex cerebral com moderado manguito perivascular mononuclear na substância cinzenta (HE, aumento 200X) 78
- Figura 28** Cerebelo com moderado infiltrado mononuclear meníngeo (HE, aumento 100X) 78
- Figura 29** Tálamo com intenso manguito perivascular mononuclear no neurópilo (HE, aumento 100X) 79
- Figura 30** Óbex com moderado manguito perivascular mononuclear no neurópilo (HE, aumento 200X) 79
- Figura 31** Rim. Cortical renal com intenso infiltrado inflamatório mononuclear na túnica média e adventícia e hialinização na túnica média (HE, aumento 100X)..... 80
- Figura 32** Filograma das sequências nucleotídicas obtidas neste estudo alinhadas com as sequências do OvHV-2 disponíveis no GenBank. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros, com *bootstrap* de 1000 réplicas. *Amostras sequenciadas neste estudo..... 82
- Figura 33** Monocamada de células MDBK sem efeito citopático. 83
- Figura 34** Reação qPCR, sistema TaqMan®, das 15 passagens em cultura celular de SNC positivo para OvHV-2 e controle positivo 10^3 cópias de DNA/ μ L. 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentrações dos <i>primers forward</i> e <i>reverse</i> em nM.	44
Tabela 2 Concentrações dos <i>primers forward</i> , <i>reverse</i> e <i>probe</i> em nM.	46
Tabela 3 Amostras positivas para OvHV-2 e sequenciadas. *NI=não informado.....	49
Tabela 4 Quantificação das diluições seriadas em <i>Nuclease-free water</i> do OvHV-2	60
Tabela 5 Diluições em <i>Nuclease Free Water</i> do DNA padrão, média da Cp e das concentrações de DNA por μ L Sistema SYBR®Green.....	68
Tabela 6 Diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 DNA padrão, média Cp e das concentrações de DNA por μ L- Sistema SYBR®Green...	70
Tabela 7 Diluições em <i>Nuclease Free Water</i> do DNA padrão, média da Cp e das concentrações de DNA por μ L Sistema TaqMan®	72
Tabela 8 Diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2do DNA padrão, média da Cp e das concentrações de DNA por μ L- Sistema TaqMan®. ...	74
Tabela 9 Identificação e dados das amostras positivas pelas técnicas moleculares. *NI: Não informado.....	75
Tabela 10 Comparação dos resultados obtidos entre as técnicas de PCR qualitativa e qPCR das 291 testadas para OvHV-2.	76

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Certificado do comitê ética frente	105
Anexo 2 Certificado do comitê de ética verso.....	106
Anexo 3 Identidade entre as 13 amostras sequenciadas, baseada nas sequências de aminoácidos do ORF75.....	107
Anexo 4 Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN).....	109
Anexo 5 Matriz de identidade das sequências referência GenBank e as 13 amostras sequenciadas neste estudo.....	110

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

DNA.....	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
AIHV-1	alcelaphine herpesvírus-1
AIHV-2	alcelaphine herpesvírus-2
ATB	antibiótico
bpm	batimentos por minuto
EtBr	brometo de etídeo
cm	centímetro
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
ddNTP	didesoxinucleotídeo trifosfato
SDS	dodecil sulfato de sódio
EEB	Encefalopatia Espongiforme dos Bovinos
CI-ELISA.....	ensaio imunoenzimático indireto competitivo
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCM.....	Febre Catarral Maligna
FCM-GA	Febre Catarral Maligna gnu-associada
FCM- AO	Febre Catarral Maligna ovino-associada
x g	Força Centrífuga
FORM SN.....	Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica
CO ₂	gás carbônico
°C	Grau Celsius
g	Gram
HE	hematoxilina e eosina
BoHV-1	Herpesvírus Bovino-1
BoHV-5	Herpesvírus Bovino-5
CpHV-2	herpesvírus caprino- 2

OvHV-2.....	Herpes vírus ovino tipo 2
OH	hidroxila
Tris-HCL	Hidroximetil Amino Metano-Ácido clorídrico
HiHV-1	hippotragine herpesvirus-1
h	Hora
IB	Instituto Biológico
IL 10	Interleucina 10
Kb	kilobase
Lanagro	Laboratórios de Referência Animal
LVB	Laboratório de Víroses de Bovídeos
Cp	Limiar de detecção da PCR quatitativa
MDBK	<i>Madin and Darby Bovine Kidney</i>
w/V	massa/volume
®	Marca Registrada
MEM.....	meio essencial mínimo
µm	micra
µg	micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mM	Milimolar
mL	mililitros
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
min	Minuto
M	molar
ng	nanograma
nM	nanômetro
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal

pb	Pares de base
FGARAT	phosphoribosylformylglycinamide synthase
pmol	picomolar
PNCRH	Plano Nacional de Combate da Raiva dos Herbívoros
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
PNEEB	Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
s	segundos
SNC	sistema nervoso central
SFB	soro fetal bovino
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
T _m	temperatura de <i>Melting</i>
Ct	Threshold Cyclers
TAE	Tris/acetato/EDTA
TBE	Tris / Borato /EDTA
TE	tris/EDTA
UV	Ultra Violeta
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina
MCFV-WTD	Vírus da Febre Catarral Maligna <i>white-tailed deer</i>
VN	virusneutralização
V	Voltagem
FAM	6-carboxy-fluorescein
TAMRA	6-carboxytetramethylrhodamine

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 ETIOLOGIA	5
3.2 EPIDEMIOLOGIA	6
3.3 CICLO DE VIDA	7
3.4 PATOGENESE	8
3.5 TRANSMISSÃO	9
3.6 SINAIS CLINICOS	10
3.7 DIAGNÓSTICO	13
3.8 ACHADOS DE NECROPSIA	14
3.9 ACHADOS HISTOLÓGICOS	15
3.10 CONTROLE, TRATAMENTO E PROFILAXIA	16
3.11 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	16
3.12 PCR QUALITATIVA	17
3.13 PCR QUANTITATIVA (qPCR)	20
3.13.1 Sistema TaqMan®	21
3.13.2 Sistema SYBR® Green	22
3.14 GENOMA OvHV-2 E SEQUENCIAMENTO	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.2 Análise histológica	31
4.2.1 Desidratação, diafanização e emblocagem em parafina dos tecidos	31
4.2.2 Preparo das lâminas histológicas para coloração por H.E.	32
4.3 Análise Molecular	32
4.3.1 Extração do Ácido Nucleico de material <i>in natura</i>	32
4.3.1.1 DNAzol®	33
4.3.1.2 Trizol®	33
4.3.1.3 Wizard® Genomic DNA Purification	34
4.3.2 Extração Ácido nucleico de material parafinado	34
4.3.2.1 NucleoSpin® FFPE DNA	35
4.3.2.2 Invisorb® Spin Tissue Mini Kit	35
4.3.2.3 innuPREP® DNA Mini Kit	36
4.3.2.4 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	37

4.3.2.5	Hight Pure FFPE DNA Isolation Kit.....	37
4.3.2.6	Protocolo proposto por CHAN e colaboradores (2001)	38
4.3.2.7	Protocolo proposto por Nascimento e colaboradores (2003)	38
4.3.3	Dosagem do Ácido Nucleico.....	39
4.3.4	Determinação da amostra controle positivo padrão	39
4.3.5	Padronização da PCR qualitativa	41
4.3.6	Análise do amplificado.....	43
4.3.7	Padronização da PCR quantitativa	43
4.3.8	Validação da PCR qualitativa e qPCR	47
4.3.9	Controles positivos e negativos	48
4.3.10	Caracterização do vírus por sequenciamento.....	49
5.	RESULTADOS	54
5.2	Padronização da Extração.....	54
5.3	Determinação da amostra controle positivo padrão	57
5.4	Padronização e Validação da PCR qualitativa	61
5.5	Padronização e validação da qPCR – Sistema SYBR® Green.....	66
5.6	Padronização e validação da qPCR–Sistema TaqMan®	71
6.	DISCUSSÃO	85
6.1	Extração material <i>in natura</i>	85
6.2	Extração material parafinado	85
6.3	Padronização e validação da PCR qualitativa e qPCR	87
6.4	Análise das amostras positivas.....	91
6.5	Isolamento viral em cultura celular.....	93
7.	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

Encefalites e encefalopatias constituem um grupo de enfermidades que podem ser causadas por diferentes agentes entre eles bacterianos, parasitários, neoplásicos, tóxicos e metabólicos, cujos principais sinais clínicos incluem fraqueza, letargia, incoordenação, ataxia, agressividade e convulsões. São enfermidades geralmente fatais e causam fortes impactos na saúde pública, grandes perdas econômicas no mundo todo e atuam como barreira sanitária ao comércio internacional (PITUCO et al., 2003). O efetivo sistema de vigilância sanitária para essas síndromes pelos serviços veterinários é importante para detecção precoce do agente causal dessas doenças, propiciando atendimento em tempo oportuno, evitando perdas incalculáveis para o país.

Atualmente, o Brasil é considerado um dos maiores produtores comerciais e exportador de carne bovina do mundo, o que revela os avanços da pesquisa agropecuária no setor. Neste cenário, vale ressaltar o aspecto fundamental do planejamento sanitário, pois a concentração de unidade animal por área necessariamente acarreta a proximidade dos mesmos, aumentando o risco de transmissão de doenças infectocontagiosas. Portanto, considerando-se a importância estratégica da pecuária bovina na economia nacional, baseada nos indicadores e nos valores expressivos oriundos da atividade do agronegócio, torna-se fundamental a adoção de medidas para contribuir com a vigilância sanitária dos rebanhos, com ênfase no diagnóstico diferencial de febre aftosa e diagnóstico diferencial de encefalites e encefalopatias, principais barreiras sanitárias impostas pelos países importadores de produtos de origem bovina.

Por isso, é de grande importância o diagnóstico diferencial de síndrome neurológica em bovinos, que cresceu desde o aparecimento da encefalopatia espongiforme dos bovinos (EEB), uma enfermidade neurodegenerativa, progressiva e fatal que afeta os bovinos.

O sistema de defesa sanitária animal brasileiro relacionado à EEB já está consolidado há décadas e permitiu ao Brasil ser classificado, até o momento, como país com risco insignificante para EEB perante a OIE. Essa classificação, mais favorável, foi conquistada devido às rigorosas medidas sanitárias que foram tomadas, incluindo diagnóstico diferencial em casos suspeitos de transtorno neurológico de agentes causadores dessa síndrome (MAPA 2014).

Apesar disso, já foram notificados dois casos atípicos de EEB no Brasil, sendo um em 2012 no Mato Grosso (OIE, 2014a) e um em 2014 no Paraná (OIE, 2014b), o que reforça e atenta para a necessidade de fortalecer as medidas sanitárias, incluindo diagnóstico diferencial de síndrome neurológica, na vigilância animal.

Desde 1997, o sistema de vigilância sanitária da EEB passou a ser realizado conjuntamente ao sistema de vigilância sanitária da Raiva animal, que é estabelecido desde 1976, fazendo parte do Plano Nacional de Combate da Raiva dos Herbívoros - PNCRH, coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2014a). Desta forma, todos os animais com doença neurológica de caráter progressivo deverão ser submetidos ao diagnóstico diferencial para Raiva, EEB e outras encefalites e encefalopatias confundíveis com EEB e também todos os bovinos destinados ao abate de emergência (BARROS; MARQUES, 2003). No entanto, a Instrução Normativa nº44, de 17 de setembro de 2013, instituiu o Programa Nacional de Prevenção e Vigilância da Encefalopatia Espongiforme Bovina (PNEEB), para evitar a entrada da doença no país (BRASIL, 2014b).

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 de encefalites como vírus da raiva, Encefalite Herpética Bovina (BoHV-5) , Rinotraqueite Infecciosa Bovina (BoHV-1), Diarreia Viral Bovina (BVDV), Doença de Aujeszky, Neosporose, Toxoplasmose, EEB, Listeriose, Hemofilose, Clostridiose, e em casos negativos, avançar na investigação incluindo outros agentes, como o vírus da Febre Catarral Maligna e assim, diminuir a lacuna diagnóstica de casos clínicos sem resposta sobre a verdadeira causa de doença do sistema nervoso central (PITUCO et al., 2003).

Torna-se imprescindível o avanço da ciência e de novos métodos diagnósticos para contribuição e elucidação de casos de doenças como FCM, sendo que as técnicas moleculares oferecem vantagens em relação aos outros testes, por apresentarem elevada especificidade e sensibilidade, permitindo a identificação do agente infeccioso, seja ele infectante ou não. A disponibilidade de utilização de um processo único, como a técnica de reação em cadeia pela polimerase quantitativa (qPCR), ou mesmo sua associação com outras técnicas moleculares como reação em cadeia pela polimerase qualitativa, pode auxiliar na padronização de aquisição de reagentes, material de consumo, equipamentos e treinamento de pessoal, além de facilitar a troca de informações entre os Laboratórios de Referência Animal (Lanagro) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Neste sentido, conhecer a situação epidemiológica dos rebanhos em relação às principais doenças confundíveis com febre aftosa, dentre elas a FCM, é fundamental para contribuir com o controle e poder reduzir os prejuízos ligados a estas, considerando também a importância da vigilância da febre aftosa na economia nacional.

Assim o trabalho, além de ampliar e disseminar o conhecimento sobre esta infecção, é importante para fortalecer os vínculos acadêmicos e científicos entre os órgãos de defesa sanitária animal, atuando diretamente em prol da defesa agropecuária do Brasil,

contribuindo para a melhoria da qualidade sanitária dos bovinos, visando o incremento à produtividade dos rebanhos, auxiliando os órgãos de defesa sanitária na tomada de medidas específicas de combate a essas doenças.

Estudos sobre a FCM são fundamentais e visam fornecer subsídios (situação epidemiológica e caracterização dos sorotipos existentes) para a vigilância sanitária da FCM, tendo em vista sua prioridade para diminuir o risco de introdução de novos sorotipos e determinar medidas de controle e prevenção eficientes contra a FCM nos rebanhos, principalmente em propriedades onde é feita a criação de bovinos e ovinos juntos. Baseado nesse conhecimento será possível fazer a vigilância e evitar as consequências socioeconômicas, contribuindo assim para oferta sustentável de alimentos suficiente. A valorização e a qualificação dos serviços da defesa sanitária animal são fundamentais para o processo de avaliação e certificação da condição sanitária dos rebanhos e pilares para a credibilidade internacional.

2. OBJETIVOS

Gerais

1. Avaliar casos suspeitos de FCM, em bovinos do Brasil, por meio de dados clínicos, patológicos e caracterização viral molecular;
2. Contribuir com a defesa sanitária animal na gestão sanitária de agentes causadores de encefalites;
3. Contribuir com a política de vigilância da febre aftosa no Brasil;
4. Fortalecer o sistema diagnóstico e manter o LVB/IB como referência nacional e internacional para apoiar os programas de prevenção e erradicação dessas doenças.

Específicos

1. Avaliar e selecionar melhor método de extração para do OvHV-2, tanto em amostras *in natura* como emblocadas em parafina;
2. Validar e padronizar a técnica de PCR qualitativa e PCR quantitativa para o OvHV-2;
3. Demonstrar a presença ou ausência do OvHV-2, causador da FCM ovino-associada, em amostras de bovinos apresentando síndrome neurológica e de pele e mucosas;
4. Avaliar a concordância dos resultados positivos pelos métodos moleculares com os achados histopatológicos característicos produzidos pelo vírus causador da FCM, em diferentes órgãos alvos;
5. Isolar o OvHV-2 em cultura celular;
6. Sequenciar e analisar as amostras positivas para o OvHV-2 para demonstrar qual a variante circulante no Brasil;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Febre Catarral Maligna é uma doença viral, aguda pansistêmica, de distribuição geográfica ampla, geralmente fatal que afeta muitas espécies de *Artiodactyla*. A doença tem sido mais frequentemente descrita como afetando espécies da subfamília Bovina e família *Cervidae*, mas também pode afetar suínos domésticos, bisão e espécies de antílopes pertencentes à subfamília *Tragelaphinae*. Ocorre após a infecção com determinados herpes vírus (OIE, 2013). O primeiro caso de FCM foi diagnosticado no Brasil em 1924 (TORRES, 1924).

3.1 ETIOLOGIA

A Febre Catarral Maligna não é causada por apenas uma única entidade etiológica. Atualmente os agentes etiológicos da FCM são incluídos em um grupo de vários gama-herpesvírus antigênicos e geneticamente relacionados, compondo assim o chamado “grupo de vírus da FCM” sendo que os vírus desse grupo são capazes de produzir infecção clínica ou subclínica em animais (LI et al., 2003).

São classificados como *Herpesvirus*, família *Gammaherpesvirinae*, gênero *Macavirus* (ICTV, 2013).

Todos os vírus pertencentes ao grupo da FCM possuem DNA de fita dupla de composição linear, simetria icosaédrica, envelopado e, assim como os outros herpesvirus, são capazes de estabelecer latência (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Atualmente, dez membros do grupo de vírus da FCM foram identificados, sendo que seis deles estão claramente associados com a doença clínica (O'TOOLE; LI, 2014).

O primeiro vírus da FCM, identificado e isolado por Plowright et al. (1960), é a forma africana, também conhecida como FCM gnu-associada (FCM-GA) em referência ao seu principal hospedeiro reservatório, os gnus. Assim, a doença é induzida pela cepa alcelaphine herpesvírus-1 (AIHV-1) transmitido por gnus (*Connochaetes taurinus* e *Connochaetes gnu*, subfamília Alcelaphine).

Outra forma é denominada FCM não associada à gnus ou FCM ovino-associada (FCM-OA), induzida pela cepa herpesvírus ovino-2 (OvHV-2), sendo que as manifestações clínicas e patológicas induzidas por ambas cepas são as mesmas, diferindo somente a epidemiologia entre as duas (SMITH, 2002), sendo que a doença causada por AIHV-1

ocorre restritamente na África, onde gnus estão presentes, e em coleções zoológicas, em outros lugares do mundo. A forma OvHV-2 da doença ocorre em todo o mundo, especificamente em áreas onde é feita, em conjunto, a criação de ovinos (OIE, 2013).

Outros membros do grupo da FCM foram isolados de búbalu (*Alcelaphus buselaphus*), topi (*Damaliscus lunatus*) (MUSHI et al., 1981) e de palanca-vermelha (*Hippotragus equinus*) (REID; BRIDGEN, 1991), determinado como alcelaphine herpesvirus 2 (AIHV-2) e hippotragine herpesvirus-1 (HiHV-1), respectivamente. No entanto essas viroses não têm sido reportadas por provocar doença clínica na natureza, mas o reconhecimento de AIHV-2 como vírus FCM em veado barbar (*Cervus elaphus barbarus*) (KLIEFORTH et al., 2002) sugere que estes vírus podem ser patogênicos para algumas espécies, sob certas circunstâncias.

Outras duas macaviroses patogênicas foram relatadas como pertencentes ao grupo de vírus FCM. Uma causada pelo vírus da Febre Catarral Maligna *white-tailed deer* (MCFV-WTD) que induz a FCM clássica em veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*) no norte da América. Há também um vírus endêmico em cabras domésticas denominado atualmente como herpesvírus caprino- 2 ou CpHV-2 (CHMIELEWICZ et al., 2001; LI et al., 2001) associado com alopecia, dermatite, perda de peso crônica e diarreia em veados sika (*Cervus nippon*) e veado-de-cauda-branca (CRAWFORD et al., 1999; LI et al., 2003).

Ainda, Li et al. (2003) evidenciam, tanto antigenicamente como em sequência de DNA, quatro vírus, anteriormente não reconhecidos pertencente ao grupo de vírus FCM, em boi-almiscarado (*Ovibos moschatus*) (Muskox-MCFV), em íbex-da-núbia (*Capra nubiana*) (Ibex-MCFV), em órix Sul-Africano (*Oryx gazella*) (Gembok-MCFV) e, mais recentemente, em aoudad (*Ammotragus lervia*) (Aoudad-MCFV) (LI et al, 2005)

Assim, caprinos e ovinos são os hospedeiros naturais do OvHV-2. Bovideos (gado, bisão, búfalos) e cervídeos (veado e alse) e suínos são propensos à doença linfoproliferativa FCM.

No Brasil, a FCM é frequentemente relacionada ao herpesvírus ovino do tipo 2 (OvHV-2) (GARMATZ et al. 2004).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

A Febre Catarral Maligna tem distribuição geográfica mundial. Na maioria dos casos clínicos, o agente causal está relacionado com o lugar em que ocorre (GARMATZ et al. 2004).

A forma gnu associada geralmente ocorre na África, conhecida por isso como forma africana, porém pode ocorrer em zoológicos em outros países (HEUSCHELE et al., 1985)

A forma associada a ovinos (ou ovino-associada) tem sido relatada em todo o mundo, tanto na América do norte incluindo Estados Unidos, Canadá (referida por isso, às vezes, como forma americana), como também na Austrália, Nova Zelândia, Escandinávia, Ásia e Europa (RADOSTITS et al., 2000; ABANEH et al., 2012) incluindo isolamento recente num surto no Egito (BASTAWECY; EL-SAMEE, 2012) e em países da América do Sul como Uruguai (PRELIASCO et al., 2013) e na Argentina (BRATANICH et al., 2012). No Brasil tem sido descrita frequentemente em bovinos (TORRES, 1924; DÖBEREINER; TOKARNIA, 1959; SAMPAIO et al., 1972; OLIVEIRA et al., 1978; BARROS et al., 1983; MARQUES et al., 1986; RIET-CORREA et al., 1988; FIGUEIREDO et al., 1990, BAPTISTA; GUIDI, 1998; SILVA et al., 2001; LUVIZOTTO et al., 2010; LUCENA et al. 2010; FURLAN et al., 2012; HEADLEY et al., 2012) e cervídeos (COSTA; PIRES, 1990; DRIEMEIER et al., 2002). A forma ovino-associada é encontrada inclusive na África, porém sua frequência é mais baixa que a forma gnu-associada (PLOWRIGHT, 1960).

3.3 CICLO DE VIDA

Dada a conservação entre os herpesvírus, das proteínas envolvidas na invasão da célula, na replicação e no ingresso, a pesquisa de um pode sugerir mecanismos semelhantes em outros (LEVY, 2011).

Durante a infecção inicial, herpesvírus fazem contato celular usando uma glicoproteína para se ligar ao receptor da célula. Uma vez o contato feito, um complexo formado por três outras glicoproteínas interage com o receptor específico, baseado no tipo de célula. Para iniciar a fusão da membrana, um complexo contendo glicoproteína gB, gL e gH é necessário. A gB desempenha papel na ligação da célula alvo, fusão do envelope com a membrana celular e maturação viral. Na endocitose, um lisossoma-independente diminui o pH, formando um vacúolo que provoca uma mudança conformacional na gB que induz a fusão das duas membranas e desenvolvimento do vírion, liberando o nucleocapsídeo e tegumento no citoplasma. Dentro do citoplasma, a fosforilação de uma proteína do tegumento desassocia o tegumento externo do tegumento interno e nucleocapsídeo. Interações com a célula transportam (pelos microtubos) esse complexo até o núcleo. Há a interação do capsídeo com o poro do núcleo e inserção do genoma viral. Uma vez no núcleo, inicia-se a replicação lítica, onde vírions são produzidos ou estabelece latência, no qual o epissoma viral torna-se associado com histonas celulares (LEVY, 2011).

Durante a reativação viral, os nucleossomos virais tornam-se instáveis e menos densos, o que permite o acesso aos ORFs previamente bloqueados para a transcrição. A replicação dos herpesvírus é realizada através de três ondas de expressão do ORF viral : imediato-precoce (pico 2-4h pós infecção), precoce (pico de 5-7h após a infecção) e tardia (pico de 7-15h pós a infecção). Os ORFs imediato-precoce inicia a transcrição de genes como a DNA polimerase, codificada pelo ORF9 no OvHV-2, proteína de ligação do ssDNA (OvHV-2, Ov 4.5), DNA helicase-primase (OvHV-2, ORF40, ORF44 e ORF56) uma proteína de ligação de origem (ainda não definida em OvHV-2) e as enzimas relacionadas com o metabolismo de nucleotídeos. Após replicação do genoma, inicia-se a transcrição final dos ORFs, que codificam proteínas estruturais que formam cápside, em que o genoma recém produzido será empacotado. Uma vez traduzido em resposta à replicação do DNA viral, no final, proteínas da cápside são transportados para o núcleo e há a formação do nucleocápsideo. Uma vez o nucleocápsideo formado, sai através da membrana nuclear e entra no citoplasma para a associação com proteínas do tegumento, envolvido pelo Golgi e é liberado para o espaço extracelular por exocitose (LEVY, 2011).

3.4 PATOGENESE

Até o presente momento existem muitas hipóteses sobre a patogênese da FCM, porém nenhuma é totalmente clara.

A FCM é caracterizada pela depleção dos níveis de interleucina 2 (que induz a maturação do linfócito B e células T) no linfonodo hospedeiro e proliferação de células *natural killer*, as quais tem a capacidade de se infiltrar em vários tecidos e células alvo sem a restrição do complexo de histocompatibilidade classe II (CUNHA et al., 2008)

Provavelmente, a replicação do OvHV-2 em cordeiros está restrito no trato respiratório enquanto que em bovinos a replicação foi encontrado no cérebro, rim, intestino e bexiga. O DNA viral pode ser detectado em células mononucleares circulantes e na maioria dos tecidos por métodos moleculares (CUNHA et al., 2008)

Como em alguns casos houve ausência do vírus nas lesões características, sugere-se que a lesão seja resultante de alteração na atividade linfocitária supressora, desencadeando a proliferação linfóide e atividade descontrolada das células *natural killer*, desencadeando o dano tecidual. Embora o mecanismo do recrutamento dos linfócitos TCD8 e o dano tecidual sejam ainda desconhecidos, alguns achados (SIMON et al., 2003; GARMATZ et al., 2004) demonstraram que o infiltrado celular predominante nas lesões de FCM aguda é infectado por OvHV-2, o que possibilita a patogênese estaja primariamente relacionada a interações

diretas do vírus com as células ou talvez a respostas imunomediadas diretas contra células infectadas, ao invés dos efeitos causados pela infecção e disfunção de células linforregulatórias que resultariam em proliferação benigna de linfócitos-T, sendo que restrição do complexo de histocompatibilidade e macrófagos também parecem ter um papel na patogênese (GARMATZ et al., 2004).

3.5 TRANSMISSÃO

O modo de transmissão da FCM ainda é pouco conhecido. Sabe-se que pode ser transmitido de modo direto (através do contato de animal infectado e não infectado) ou por modo indireto (através do contato de animal não infectado com fômites ou materiais contaminados) (FURLAN et al., 2012).

Casos são frequentemente vinculados a propriedades ou lugares onde há criação consorciada entre portadores assintomáticos e sintomáticos do vírus do grupo FCM. No Brasil, a maioria dos casos estão associados a propriedades onde há criação de bovinos e ovinos juntos. Entretanto, também há casos de FCM diagnosticados em propriedades onde a criação era exclusivamente de bovinos (FURLAN et al., 2012).

A maioria dos cordeiros é infectada entre dois meses e dois meses e meio de vida. Trabalhos indicam que a remoção dos mesmos do contato com animais infectados antes dessa idade permite a criação de animais livres da infecção por OvHV-2 (EHLERS et al., 1999). O ápice da excreção viral ocorre aos cinco meses em ovinos, mas ainda não se entende o papel dos caprinos na transmissão do vírus.

Eventos como alterações de manejo e estresse são considerados fatores cruciais para que o vírus reative, passando a ser eliminado pelo ovino, propiciando a transmissão entre as espécies. Eventos reprodutivos como gestação e parição são constantemente apontados como causa primária de estresse em ovelhas, propiciando condições para eliminação viral para o ambiente (FURLAN et al., 2012).

As principais fontes da infecção são as secreções nasais e oculares, tanto em ovinos quanto em gnus, sendo que a transmissão ocorre mais eficientemente pelo contato íntimo, mas outros meios, como água compartilhada, também são facilitadores (LI et al., 2001).

Ainda existe a possibilidade de transmissão por vetores mecânicos como insetos. Enquanto nas espécies adaptadas a infecção é silenciosa e ocorre a replicação e transmissão do vírus, aquelas em que o agente está pobremente adaptado são as vítimas diretas da enfermidade, sofrendo os sinais clínicos, geralmente fatais (LI et al., 2001).

Há relatos de casos de transmissão transplacentária de FCM em bovinos (PLOWRIGHT,1960) e deve ser considerada a possibilidade que bovinos infectados intrauterina ou que animais silvestres afetados por FCM (DRIEMEIER et al., 2002) sirvam de portadores do vírus, ou ainda animais que adoeceram e se recuperaram.

3.6 SINAIS CLINICOS

O período de incubação da FCM, na infecção natural, varia geralmente de três a 10 semanas (RADOSTITIS et al., 2000), mas pode chegar a 200 dias (SMITH, 2002). O curso da doença, geralmente, é de três a sete dias e, raramente, prolonga-se por mais de 14 dias (RADOSTITS et al., 2000).

Segundo Garmatz et al (2004) os sinais clínicos da FCM tem sido classificados nas formas hiperaguda, “cabeça-e-olho”, digestiva (alimentar), encefálica, dérmica e leve ou branda, dependendo da intensidade e duração dos sinais clínicos.

Na forma hiperaguda os sintomas são febre alta, dispneia, gastrenterite hemorrágica aguda e rápida perda de peso, podendo ocorrer morte súbita. O curso clínico da doença aguda é de 3 a 7 dias (GARMATZ et al., 2004).

A forma “cabeça-e-olho”, que é a síndrome clássica da FCM, caracteriza-se pelo aparecimento súbito de sinais relacionados à cavidade oral, oculares, respiratórios e febre.

Os sinais relacionados à cavidade oral são hiperemia e erosões focais ou difusas no palato duro, gengiva, almofada dental, comissuras labiais, lábios e superfície dorsal da língua, o que pode confundir com doenças vesiculares como, por exemplo, febre aftosa (figura 2). A mucosa é frágil e desprende-se facilmente. As pontas das papilas bucais são hemorrágicas com necrose das extremidades; com o tempo acabam se desprendendo e a papila assume um aspecto rombo. Nesse estágio há intensa salivação (GARMATZ et al., 2004).

Os sinais relacionados à cavidade ocular iniciam-se com secreção ocular serosa ou seromucosa, que pode se tornar mucopurulenta à medida que a doença progride. A opacidade de córnea é característica (figura 1A); geralmente inicia na junção córnea-esclera e se estende centripetamente, envolvendo às vezes toda a córnea causando cegueira. Geralmente há opacidade bilateral da córnea e, na maioria das vezes, é acompanhada de hiperemia da conjuntiva e episclera, edema de pálpebra, blefarospasmo e fotofobia. Hipópion, glaucoma, petéquias nas conjuntivas e vascularização córnea ocorrem em alguns casos (GARMATZ et al., 2004).

Os sinais respiratórios incluem descarga nasal, inicialmente serosa, progredindo a mucopurulenta, dispneia e estertor devido à obstrução da cavidade nasal com exsudato, sendo que a congestão e necrose superficial são evidentes na mucosa nasal anterior. Ocasionalmente observam-se erosões recobertas por placas. Epistaxe bilateral intensa e tosse podem ocorrer. A pele do focinho pode apresentar ulcerações recobertas por crostas resultantes do ressecamento de exsudato e tecido necrosado (GARMATZ et al., 2004).

A forma alimentar é caracterizada por diarreia fétida, profusa, muitas vezes hemorrágica (melena acentuada) e perda de peso. Essa forma intestinal é comum em cervídeos (GARMATZ et al., 2004).

Na forma encefálica, há encefalite sendo que os sinais clínicos de distúrbios nervosos geralmente são tardios e inclui fraqueza, letargia, incoordenação, ataxia, agressividade e convulsões sendo que tremores musculares podem aparecer precocemente, e nistagmo, pressão da cabeça, paralisia e convulsões geralmente ocorrem nos estágios finais (RIET-CORREA et al., 1988).

Na forma dérmica, lesões cutâneas, especialmente na forma ovino-associada, são comuns, mas frequentemente passam despercebidas. Em casos de longa duração, as alterações de pele, inclui hiperemia, pápulas e exantema com exsudação e crostas envolvem o tórax, abdômen, região inguinal, axilas, prepúcio, períneo, úbere, parte inferior dos membros e ocasionalmente a cabeça. A pele dos tetos, vulva e escroto pode se desprender completamente ou tornar-se coberta por crostas secas. Laminite pode ser pronunciada e pode ocorrer desprendimento da capa córnea dos chifres ou dos cascos (GARMATZ et al., 2004).

A forma leve ou branda é descrita comumente em animais experimentais, onde há febre transitória, acompanhada de erosões discretas nas mucosas oral e nasal, secreção nasal, diarreia com muco e lesões ulcerativas entre os dígitos, podendo seguir-se por completa recuperação, recuperação com recrudescimento ou por FCM crônica, sendo que uma característica distinta da forma crônica é a persistência de leucoma ocular bilateral (GARMATZ et al., 2004).

Nos casos de doença natural, os linfonodos tendem a aumentar progressivamente durante o curso clínico, sendo que linfadenopatia é um dos achados mais consistentes e persistentes na doença experimental (GARMATZ et al., 2004).

Na FCM, a febre é frequente e varia de 41°C a 42,2°C. Ocasionalmente observa-se hematúria. Outros sinais clínicos incluem apatia, anorexia, agalactia e pulso acelerado de 100-120/bpm (GARMATZ et al., 2004).

Os tecidos primariamente afetados são os órgãos linfóides, tecidos epiteliais, principalmente do sistema respiratório e do trato gastrointestinal, e os vasos. Rins, fígado (figura 1B), olho, articulações e sistema nervoso central geralmente são afetados

(CARLTON; McGAVIN, 1998).

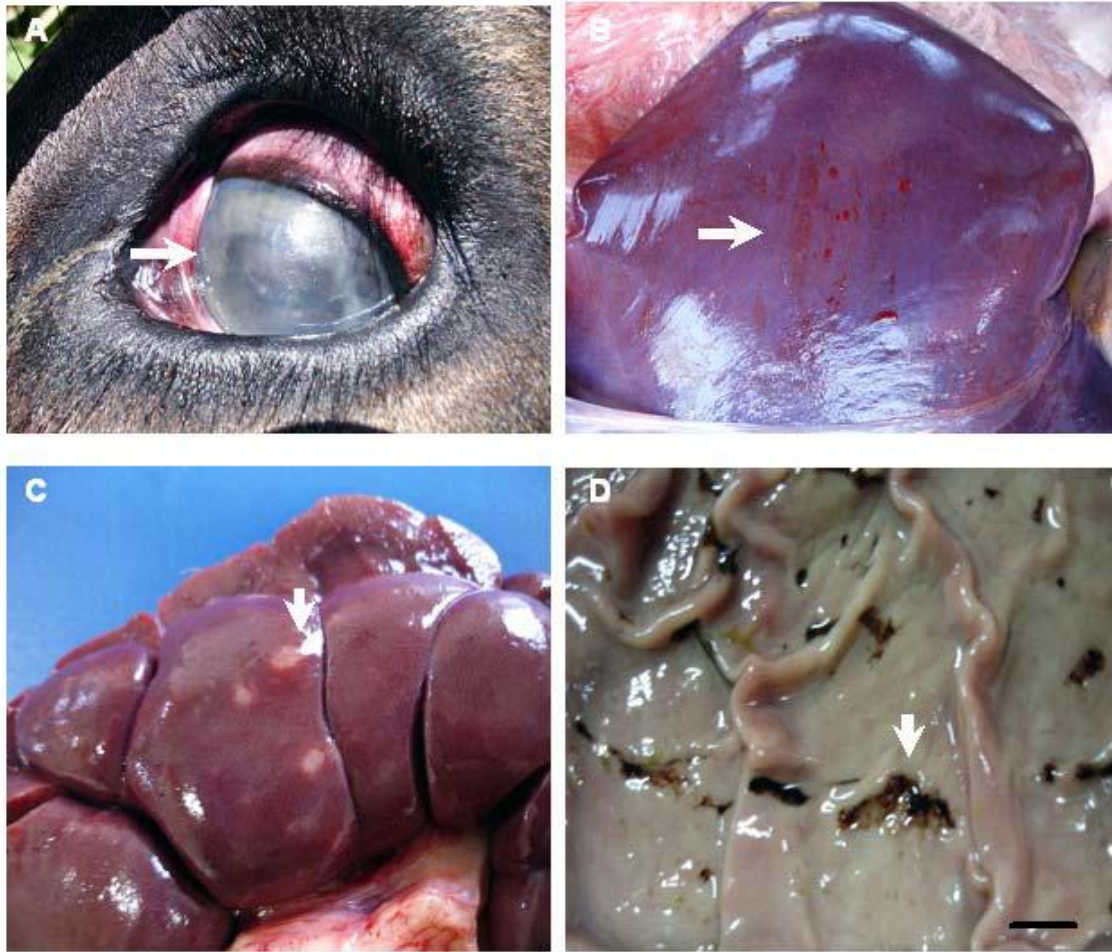


Figura 1 A: opacidade da córnea;; B: fígado hemorrágico; C: pequenas manchas brancas no rim D Superfície da mucosa do abomaso com ulcerações necrosupurativa (setas) com exsudato amarelo-esverdeado. Fonte: LUVISOTTO et al., 2010.



Figura 2 Erosão na mucosa vesical (esquerda) e mucosa oral (direita). Fonte: Dr. Claudio Depes

3.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da FCM é dependente do agente causador e pode ser realizado pelo histórico, dados epidemiológicos, sinais clínicos, lesões observadas na necropsia, por métodos de imunodiagnóstico e determinação genômica do DNA viral no sangue ou tecidos de animais doentes. No entanto é importante salientar que, para o diagnóstico de FCM, é necessário apoio laboratorial já que os sinais clínicos são inespecíficos (GARMATZ et al., 2004).

Para a forma gnu associada, o diagnóstico laboratorial e identificação do agente pode ser feito por isolamento viral de órgãos afetados como linfonodo, baço e leucócitos (OIE, 2013). A transmissão experimental para bovinos ou coelhos também pode ser usada como método de diagnóstico, utilizando sangue total, esfregaço nasal ou linfonodos (SMITH, 2002). Também pode ser feita a detecção de ácido nucléico viral pela PCR, a partir de sangue total ou tecidos coletados na necropsia, uma vez que a sequência completa do isolado C500 foi publicado, permitindo o desenho de *primers* para reações da PCR a partir de regiões conservadas do genoma (LI et al., 2005). A infecção pode ser confirmada por sorodiagnóstico pela detecção de anticorpos no soro de animais clinicamente afetados pelos métodos de imunofluorescência, imunoperoxidase, ensaio imunoenzimático indireto competitivo (CI-ELISA) e virusneutralização (VN), porém estes testes indiretos são complementares, uma vez que a resposta de anticorpos de animais clinicamente afetados é limitada, sem desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (OIE, 2013).

O diagnóstico da forma ovino-associada baseia-se nos sinais clínicos e exame anátomo-patológico. O exame histológico de tecidos, incluindo, por preferência, *rete mirabile* carotídea, rim, fígado, bexiga, epitélio bucal, córnea conjuntiva e cérebro, tem sido o único método de diagnóstico utilizado até o momento. Testes complementares são necessários para confirmação do agente envolvido, seja por detecção de anticorpos para o vírus e / ou DNA viral. Contudo, pelas características da doença, o diagnóstico *ante-mortem*, para detectar os casos pré-clínico de FCM ovino-associada, devido à indisponibilidade de exames de imunodiagnóstico e de métodos moleculares validados para a pesquisa do agente em amostras de sangue, por exemplo, é um desafio.

Pela grande dificuldade em isolar o OvHV-2 em sistemas biológicos *in vivo* e *in vitro* (OIE, 2013), a PCR para detectar DNA viral em leucócitos do sangue periférico de animais afetados no exame *ante-mortem*, bem como em tecidos *in natura* obtidos na necropsia como emblocados em parafina no exame *post-mortem*, o teste mais recomendado (BAXTER et al., 1993)

Assim, a técnica da PCR é uma boa opção para o diagnóstico da FCM associada a

ovinos. Suas vantagens sobre o exame histopatológico incluem: a técnica pode ser aplicada tanto no exame *ante-mortem* como *post-mortem*; tem grande sensibilidade e especificidade; permite diagnosticar casos de FCM que não apresentem todos os sinais clínicos clássicos, como os casos crônicos com recuperação da doença clínica e a aplicação da técnica em tecidos fixados e emblocados em parafina pode ser utilizada para caracterizar o agente, especialmente em estudos retrospectivos (GRAMATZ et al., 2004).

3.8 ACHADOS DE NECROPSIA

Os principais achados de necropsias em animais acometidos por FCM estão presentes principalmente nos tratos respiratório e digestivo, linfonodos, sistema nervoso central (principalmente *rete mirabile* carotídea), olhos, fígado, rins sendo que os tecidos primariamente afetados são os órgãos linfóides, tecidos epiteliais, principalmente do sistema respiratório e do trato gastrointestinal, e os vasos, seguido com alterações macroscópicas nos rins, fígado, olho, articulações, sistema nervoso central e bexiga (BARKER et al., 1993).

Nos olhos há edema de córnea com conjuntiva e esclera hiperêmica. São frequentes erosão e ulceração e hiperemia nasal, oral e de mucosa de esôfago que, com o tempo, desenvolve múltiplas erosões e ulcerações cobertas por exsudato seroso ou mucopurulento.

Na cavidade oral, palato mole, esôfago, retículo e rúmen pode haver hiperemia, hemorragia, necrose epitelial e erosões sendo que as lesões no abomaso são mais extensas (figura 1D) (RADOSTITS et al., 2000).

Os pulmões encontram-se com edema, congestos e com broncopneumonia inespecífica secundária (casos crônicos), com leve exsudato pleural (SMITH, 2002).

A parede intestinal torna-se espessa, edematosa, com petéquias, congesta e normalmente com ulceração. As fezes são enegrecidas e muco sanguinolenta. Os linfonodos são edematosos, congesto e hemorrágicos com áreas multifocais de necrose. Normalmente observa-se hepato e esplenomegalia (LIGGITT et al., 1978)

No sistema nervoso central há petéquias de cerebelo e meninges. Nos rins há pontos esbranquiçados (figura 1C), petéquias e infartos. Na bexiga há áreas hemorrágicas. As glândulas adrenais ocasionalmente estão aumentadas de volume, friáveis, com hemorragia nas áreas cortical e capsular (LIGGITT et al., 1978)

As feridas na boca impedem que o animal se alimente adequadamente e a carcaça encontra-se desidratada, com atrofia serosa da gordura. As mucosas da faringe e laringe é hiperêmica e edemaciada e com o tempo desenvolvem-se múltiplas erosões e ulcerações

cobertas por exsudato seroso ou mucopurulento ou, ocasionalmente, por pseudomembranas (BARKER et al., 1993; BARNARD et al., 1994; SMITH, 2002)

3.9 ACHADOS HISTOLÓGICOS

A FCM é caracterizada histopatologicamente por lesões vasculares, necrose epitelial e infiltrado linfóide primariamente perivascular em muitos órgãos, proliferação linforreticular e destruição de pequenos linfócitos em órgãos linfóides como baço e linfonodos sendo que vasculite necrosante e fibrinóide generalizada são as lesões histológica característica da FCM (PLOWRIGHT, 1960; NAKAJIMA et al., 1992).

A doença pode afetar múltiplos órgãos e tecidos, mas é evidente em alguns locais como *rete mirabile* carotídea, rim, encéfalo e leptomeninges cerebral e espinhal, tríade portal, cornetos etmoidais, pulmão, olho, coração, cápsula dos linfonodos, cápsula e medula adrenal, glândula salivar, cordão espermático, ligamento largo e qualquer área da pele ou trato alimentar com lesões macroscópicas (LIGGITT; DeMARTINI, 1980; THAM 1997).

Nas lesões vasculares, observam-se concentrado de células mononucleares na adventícia, principalmente, e necrose fibrinóide na camada média, podendo ser focais ou segmentadas e envolve toda a parede ou uma das túnicas (BARKER et al., 1993). Nos casos crônicos há arteriopatia obliterante crônica, arterite linfocítica e arteriosclerose (GAMARTZ et al., 2004).

Nas lesões inflamatórias há infiltrado mononuclear perivascular e intramural, constituído principalmente por linfoblastos com núcleo grande e nucléolo proeminente ocorrendo aumento progressivo na intensidade dos acúmulos inflamatórios e lesões degenerativas e necróticas, conforme for se agravando os sinais clínicos. É muito comum observar hiperplasia linfóide. No rim há infiltrado linfóide intersticial focal e perivascular (BARNARD et al., 1994).

No sistema nervoso central, é observada meningoencefalite não-supurativa, com infiltrado linfóide nas meninges e túnicas adventícia e média dos vasos sanguíneos das meninges e substância encefálica. Há excesso de líquido cefalorraquidiano, contendo grande quantidade de proteína e células mononucleares (GAMARTZ et al., 2004).

Nos olhos, as principais lesões observadas são vasculite linfocítica da esclera, retina e úvea, ceratite com edema de córnea e vascularização. Ceratite estromal central bilateral crônica é comum em bovinos com FCM crônica (O'TOOLE et al., 1997).

Nas articulações, há acúmulo de células linfóides, que estão presentes em subepiteliais e epiteliais na maioria das membranas sinoviais. O epitélio sinovial é necrótico com maior acúmulo linfoide (LIGGITT et al., 1978).

Assim, as principais alterações histológicas da FCM consistem em vasculite necrosante caracterizada por infiltrado de linfoblastos, linfócitos, plasmócitos e histiócitos na túnica média, adventícia e espaço perivascular associado à necrose fibrinóide generalizada de parede dos vasos, infiltrado celular mononuclear em múltiplos órgãos e necrose de células epiteliais de revestimento, sendo que esses infiltrados são mais intensos no encéfalo e rim.

3.10 CONTROLE, TRATAMENTO E PROFILAXIA

Ainda não há um tratamento específico para a FCM. Para seu controle é necessário minimizar o contato entre animais portadores e susceptíveis, especialmente durante a fase de parição de cordeiros. Em casos em que a convivência próxima entre as espécies é inevitável (como zoológicos), sugere-se testar os animais para a presença da infecção. Até hoje não foi desenvolvida uma vacina que seja eficiente no controle desta doença (OIE, 2013).

3.11 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A FCM representa um grande desafio para o diagnóstico tanto clínico como patológico, uma vez que estes são confundíveis com outras doenças neurológicas e de pele e mucosas e os sinais clínicos clássicos da FCM, como febre e linfadenopatia generalizada, nem sempre são evidentes, especialmente em casos agudos de espécies suscetíveis. Dentre os testes laboratoriais para diagnóstico de FCM, a detecção de DNA genômico por PCR é um dos melhores (DONALD et al., 2007). A principal vantagem da PCR em relação a outros métodos é a redução do tempo para obtenção de resultados. Além disso, a PCR apresenta maior sensibilidade e especificidade, representando um método laboratorial rápido e preciso. No entanto, embora altamente sensível, o uso de PCR qualitativa como método de rotina para confirmação clínica de FCM nos laboratórios de diagnóstico pode ser problemático, devido a ser susceptível a significativa contaminação do *amplicon* e ser mais demorado se

comparado com a PCR quantitativa.

Sendo assim, a PCR quantitativa pode tornar-se o teste de escolha. Com o seu surgimento, os métodos de diagnóstico foram aperfeiçoados, ocorreu aumento da especificidade das reações e ainda, a leitura é feita através da captação de fluorescência, destacando como vantagem a obtenção de resultados automatizados, além de permitir a quantificação dos fragmentos de interesse e o acompanhamento das reações em tempo real. Esse método eliminou etapas, pois a amplificação e a detecção do DNA são realizadas simultaneamente em um sistema fechado, dispensando procedimentos adicionais, como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e fotodocumentação. Outras vantagens em relação a PCR qualitativa é a diminuição do risco de contaminação das amostras e resultados falso-positivos, além de evitar o uso de soluções mutagênicas, como o brometo de etídeo (OIE, 2013).

3.12 PCR QUALITATIVA

A reação da polimerase em cadeia (em inglês *polymerase chain reaction* PCR) foi desenvolvida por Kary Mullis na década de 80, causando uma revolução na biologia, tanto em pesquisa como nas áreas aplicadas, como diagnóstico e melhoramento genético.

Segundo Sambrook e Russel (2001) na PCR ocorre a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase. Baseia-se no anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos iniciadores, ou *primer*, que são pequenas sequências de DNA sintetizadas artificialmente de maneira que sejam complementares às sequências específicas que flanqueiam a região alvo do DNA.

A PCR é composta por:

- O DNA extraído que possivelmente contém o segmento a ser amplificado;
- Os nucleotídeos para a síntese das novas fitas (dNTPs: dATPs, dTTPs, dCTPs, dGTPs);
- A enzima DNA polimerase (Taq-DNA-polimerase), responsável pela síntese das novas fitas de DNA;
- Cloreto de Magnésio, que é um co-fator da reação;
- Dois *primers* específico para a região alvo do DNA;
- *Nuclease-free water* para completar o volume da reação.

Todos esses componentes formam o *mix* que, submetido à combinação adequada de temperatura e de tempo (ciclo da PCR), faz com que ocorra a amplificação.

Cada ciclo da PCR é formado por três etapas:

1. Desnaturação: Nesta fase há o rompimento das pontes de hidrogênio por meio da elevação da temperatura e o DNA perde a estrutura de dupla hélice permitindo que os *primers* se liguem à região complementar;
2. Anelamento: Nesta etapa ocorre a ligação dos *primers* nas respectivas regiões alvo complementares do DNA, sendo que a temperatura de anelamento é específica para cada *primer* e está relacionada à característica do mesmo;
3. Extensão: Nesta etapa a temperatura é elevada à cerca de 72°C, para a ação da Taq-DNA-polimerase, que se posiciona junto aos *primers* e, com o auxílio do magnésio, começa a síntese da nova fita, que se inicia a partir dos *primers*. Deste modo são formadas novas fitas de DNA de dupla hélice, correspondente a região-alvo de amplificação delimitada pelos *primers*.

Após o término de um ciclo, todo o processo é repetido várias vezes, até que se obtenha grande quantidade do DNA amplificado. A cada ciclo da reação o DNA é duplicado, assim, com a evolução da reação ocorre aumento exponencial do número das sequências, em progressão geométrica.

Para que seja visualizada a amplificação do segmento alvo do DNA pela PCR qualitativa, é realizada, posteriormente, a eletroforese.

Segundo Yung-Sharp e Kumar (1989), o princípio da eletroforese é baseado no fato de que a molécula de DNA possui carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo, que é o cátodo, sendo que a velocidade da migração depende do tamanho da molécula e, 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.

O gel de agarose é utilizado para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1kb= 1000 pares de base). É feito através da mistura de um tampão (TBE, por exemplo) e agarose (quadro 1), um polissacarídeo extraído de uma alga marinha vermelha e formado por resíduos de D e L galactose unidos por ligações glicosídicas a (1→3) e b(1→4), é um material gelatinoso e semelhante a gelatina incolor, ajustando-se a concentração apropriada para separar os fragmentos de DNA presentes na amostra, em um dado volume de tampão de eletroforese. Os dois tipos de tampão mais utilizados são TAE (Tris-acetato-EDTA) e TBE (Tris-borato-EDTA) (REINIGER et al., 2004).

Quadro 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	0,5- 10,0
1,2	0,4- 6,0
1,5	0,2-3,0
2,0	0,1-2,0

Na cuba, o gel encontra-se entre fios de platina que atuam como cátodo e ânodo, provocando a passagem de corrente elétrica, gerada por uma fonte de eletricidade.

Para se determinar a voltagem que será utilizada, deve-se calcular a distância entre os eletrodos e não o comprimento do gel. Geralmente usa-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm. Para cubas rotineiramente utilizadas pela maioria dos laboratórios de pesquisa, a voltagem varia entre 50 e 110 V (REINIGER et al., 2004).

Antes da aplicação, as amostras de DNA são misturadas a um tampão de amostra que contém corantes e reagentes de alta densidade (sacarose, glicerol ou ficol). Estes últimos asseguram que a amostra de DNA entre no poço, pela força da gravidade. Os corantes, azul de bromofenol e o xileno cianol facilitam a aplicação da amostra no gel (acrescentam cor na amostra) e auxiliam no monitoramento da corrida, uma vez que apresentam velocidade conhecida durante a migração na matriz em direção ao pólo positivo.

Para permitir uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA de uma dada amostra, é necessário aplicar em um dos poços o marcador de massa molecular, o *ladder*, que é uma mistura de diversos fragmentos de DNA de tamanhos e concentrações conhecidos, gerados a partir da digestão de plasmídeos (tipo de DNA circular presente em bactérias) com enzimas de restrição. Ele permite inferir, por comparação, o tamanho dos fragmentos presentes na amostra analisada (REINIGER et al., 2004).

Para a visualização da molécula de DNA no gel, usualmente é utilizado o brometo de etídeo (EtBr) de fórmula química $C_{21}H_{20}BrN_3$. Esse corante se intercala entre as bases dos ácidos nucleicos e, na presença de luz Ultra Violeta (entre 260 e 360nm), fluoresce em vermelho alaranjado (590nm).

Com este método pode-se detectar uma quantidade igual ou maior que 10ng de DNA e, a intensidade de fluorescência emitida é proporcional à concentração de DNA presente na amostra. No entanto, não é recomendada a utilização do brometo de etídeo no gel porque, além de interferir no padrão de migração das diversas conformações que a molécula de DNA pode assumir, há a contaminação da vidraria, da cuba e demais utensílios usados na preparação do gel e por se tratar de uma substância mutagênica (YUNG-SHARP; KUMAR, 1989).

Corantes fluorescentes atóxicos são boas alternativas (YUNG-SHARP; KUMAR, 1989) para visualizar o DNA. Alguns exemplos disponíveis no mercado são o Azul de Metileno (FLORES et al., 1992), que não apresenta potencial mutagênico e não requer luz U.V, embora apresente a desvantagem de ser pouco sensível, o SybrSafe®, um corante fluorescente que cora o DNA no gel de agarose e no gel de poliacrilamida, exibindo a mesma sensibilidade que o brometo de etídeo e visualizado no transiluminador de luz azul; e o GelRed e o GelGreen que, são termoestáveis e podem ser adicionados antes da homogeneização do gel.

Com a corrida eletroforética, os grupos de moléculas de DNA do mesmo tamanho que migram na matriz de agarose, assumem a forma do poço e constituem as bandas de DNA. Após a visualização dos resultados sob luz ultravioleta, estes são fotodocumentados utilizando um *software* capaz de transformar em imagem a intensidade relativa de fluorescência emitida pelas bandas de DNA, que são captadas por uma câmera fotográfica digital que registra a foto do gel.

3.13 PCR QUANTITATIVA (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) é capaz de monitorar o progresso da PCR ao longo dos ciclos, sendo que os dados são coletados no decorrer da reação, ao invés de serem apenas no final. Assim, a diferença básica entre a reação de PCR qualitativa e a quantitativa é que esta última ocorre em um sistema fechado e é monitorada através de um programa computacional, que avalia a evolução da técnica por meio da detecção de fluorescência dos produtos amplificados a cada ciclo de amplificação (MACKAY et al., 2002).

A detecção da fluorescência permite medir, durante a amplificação, a quantidade de DNA sintetizado, já que a fluorescência emitida é proporcional à quantidade de DNA formado, o que permite conhecer e registrar, durante as sucessivas fases da reação, a cinética de amplificação (COSTA, 2004).

A qPCR tem sido muito utilizada nos últimos anos, por ser um teste rápido e de alta sensibilidade e especificidade, pois possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nos quais os microorganismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou até mesmo em amostras altamente diluídas (BHUDEVI, WEINSTOCK, 2001).

Outras vantagens dessa técnica estão relacionadas com o fato de não existir manipulação pós-amplificação, ficando o processo com um “sistema fechado”, o que diminui os resultados falso-positivos e ou contaminações cruzadas entre amostras, além de ser

possível fazer maior número de amostras em menos tempo, o que possibilita tomadas de decisões mais ágeis nos casos de doenças de barreiras, como febre aftosa (HIGUCHI et al., 1993). Outra vantagem em relação a PCR qualitativa é a eliminação do uso direto, pelo operador, de soluções mutagênicas como o brometo de etídio (MACKAY et al., 2002).

Destacamos dois sistemas para a detecção de sequências na PCR quantitativa: Sistema TaqMan® e Sistema do corante SYBR® Green.

3.13.1 Sistema TaqMan®

O sistema TaqMan® utiliza uma sonda de hidrólise fluorescente, para permitir a detecção de um produto específico da PCR, conforme este se acumula durante os ciclos da PCR. Neste, uma sonda é construída contendo um corante *repórter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* inibe a fluorescência emitida pelo *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) através do espaço (MACKAY et al., 2002).

Se a sequência alvo estiver presente, a sonda se anela logo após um dos *primers* e é clivada através da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase, enquanto o *primer* é estendido. Esta clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher* aumentando, desta forma, o sinal do corante *reporter*. Além disso, remove a sonda da fita alvo, permitindo que a extensão do *primer* continue até o final da fita molde. Assim, há um aumento na intensidade de fluorescência, que é proporcional à quantidade de *amplicons* produzido (MACKAY et al., 2002).

As vantagens do sistema TaqMan® são as seguintes:

- É necessário a hibridização específica entre a sonda e o alvo para gerar sinal fluorescente;
- As sondas podem ser marcadas com corante *reporter* distintos e distinguíveis, o que permite a amplificação de duas sequências distintas em um mesmo tubo de reação.
- A eletroforese é eliminada, o que reduz mão-de-obra, custo e contaminação.

A principal desvantagem do sistema TaqMan® é que é necessário a síntese de diferentes sondas para sequências distintas.

3.13.2 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. Como o corante SYBR Green é intercalante de DNA, ele se liga a cada nova cópia de DNA dupla-fita e, conforme vai progredindo a reação, mais *amplicons* são gerados resultando num aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR.

As principais vantagens do sistema SYBR® Green são:

- Pode ser utilizado para monitorar a amplificação de qualquer sequência de DNA dupla-fita.
- Não é necessário a construção de sonda, o que reduz o custo e a configuração do ensaio.

A principal desvantagem do sistema SYBR® Green é poder gerar sinais falso-positivo, porque ele se liga a qualquer sequência dupla-fita de DNA, seja ela o alvo ou não. A desvantagem é a redução da especificidade ocasionada pelo aumento na emissão de fluorescência gerada por produtos de amplificação inespecíficos da PCR e dímeros de *primers* (MACKAY et al., 2002).

Para analisar a presença de dímeros de *primers* ou outros produtos de amplificação inespecíficos da PCR, utiliza-se no final da reação uma curva de dissociação, para verificação da especificidade e acurácia da quantificação (NAGY, 2006).

A curva de dissociação é baseada na aplicação de um gradiente de temperatura crescente depois da PCR, para monitorar a cinética de dissociação dos fragmentos amplificados, desta forma é possível comparar se a temperatura de *melting* (T_m) do DNA amplificado é compatível com a do DNA avaliado (COSTA, 2004).

3.14 GENOMA OvHV-2 E SEQUENCIAMENTO

O genoma dos herpesvirus consiste, basicamente, de uma única longa sequência ladeada ou separada por sequências de comprimento variável, que se repetem.

O DNA do OvHV-2 foi, primeiramente, detectado em espécies susceptíveis em 1991 e em ovelhas em 1993 (BAXTER et al., 1993).

Em 2007, Hart e colaboradores sequenciaram o genoma completo do OvHV-2 a partir de células T de uma vaca naturalmente infectada (BJ1035), revelou que o seu genoma é semelhante ao AIHV-1 e é co-linear com as outras rhadinoviroses conhecidas.

A análise desta sequência mostrou que o genoma do OvHV-2 tem um único segmento de cerca de 130kpb contendo 73 *open reading frames* (ORFs) ladeado por várias cópias de repetição terminal, em comparação com 71 ORFs no AIHV-1 (figura 3 e quadro 2).

Dos 10 genes originais descritos em AIHV-1 (A1-A10), oito são claramente homólogos ao OvHV-2, sendo que entre o A1 e A4 não há equivalências. OvHV-2 codifica genes únicos adicionais designados Ov2.5, Ov3.5, Ov4.5 e Ov8.5 (RUSSEL et al., 2009).

O Ov2.5 situa-se entre Ov2 e Ov3 (homólogos do A2 e A3) e codifica um homólogo *splice* IL-10 (interleucina 10, inibidor de macrófagos ativados). Estes genes reproduzem exatamente o local do *Splice* IL-10, mas os tamanhos dos *introns* são reduzidos. A expressão da proteína recombinante IL-10 tem típicas funções celulares. Ov3.5 ocupa uma posição análoga à A4, mas não possui similaridade na sequência. Ambos os genes codificam pequenas proteínas que desempenham funções semelhantes. Ov4.5 situa-se entre os ORFs 3 -6 do OvHV-2 e AIHV-1 e possuem genes homólogos (A4.5). O Ov4.5 e A4.5 tem similaridade com o vírus Epstein-Barr e podem estar envolvidos na regulação da morte celular. Ov8.5 situa-se entre os ORFs 69 e 73 OvHV-2 e codifica uma proteína rica em prolina, de função desconhecida (RUSSEL et al., 2009).

A proteína ORF73 é conhecida por ser antigênica. É possível que sua variação reflita a evolução rápida (em relação a outros genes) na pressão imunológica do hospedeiro e pode, pela sua variação entre isolados de diversos lugares, ser uma ferramenta útil para estudos epidemiológicos do OvHV-2.e, provavelmente, está associada à infecção latente (RUSSEL et al., 2009).

No entanto, Taus et al. (2005), identificaram 74 ORFs no genoma do OvHV-2, a partir de secreção nasal de uma ovelha, isto porque, a presença de dois nucleotídeos adicionais na sequência derivada da secreção, resultou num desvio de enquadramento, de tal modo que dois ORFs (40 e 41) estavam presentes nesta região do genoma, representando o ORF adicional no derivado de secreção, os quais, provavelmente, codificam o complexo helicase-primase, o que pode estar relacionado com a propagação e desenvolvimento do vírus *in vitro*.

Embora a função dos ORFs 58, 59 e 73, ainda não esteja totalmente esclarecida, eles representam antigênicos importantes na infecção do OvHV-2 e pode desempenhar um papel na patogênese da doença *in vivo*. Prevê-se que vacinação contra estes antigênicos ou interferência com o seu modo de ação pode interromper a infecção latente do OvHV-2 e pode prevenir o aparecimento dos sintomas da doença. Além disso, tem sido mostrado que uma proteína recombinante de ORF 59 é reconhecido especificamente por soros de bovinos infectados por OvHV-2 e poderá ser utilizado no desenvolvimento de um teste de sorodiagnóstico (COULTER; REID, 2002).

O ORF 75, região genômica alvo dos *primers* utilizados neste trabalho e também região sequenciada das amostras positivas, codifica FGARAT (phosphoribosylformylglycinamide synthase), enzima que participa no metabolismo das purinas e proteína do tegumento viral. Desta forma, é uma região altamente conservada, específica do OvHV-2 e que não cruza com outras sequências genômicas (HART et al., 2007).

A replicação lítica para a reativação do vírus é iniciada pelo ORF50, ORF57 e (supostamente) ov6, ocorre nas células epiteliais dos cornetos para serem liberadas ao ambiente (CUNHA et al., 2008).

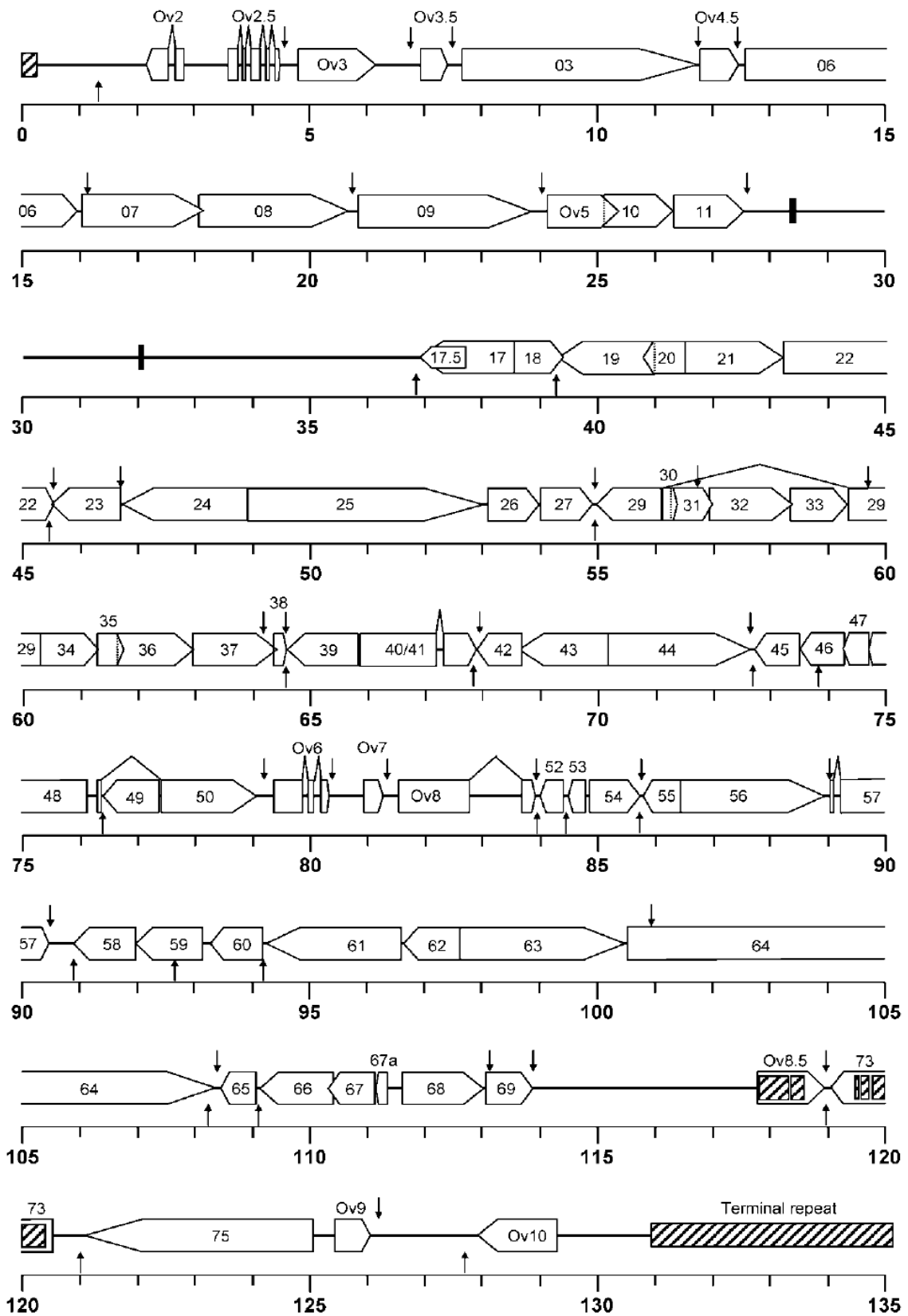


Figura 3 Esquema da organização do genoma do OvHV-2 BJ1035. ORFs estão representados por setas largas no sentido da transcrição/tradução. DNA não codificante como uma linha sólida. Os ORFs estão em escala relativa abaixo em kpb. Sítios de *Splice* é demonstrado como linhas acima conectando os éxons. Potenciais sinais de poliadenilação (AATAAA e ATAAA) está representado por setas apontadas para baixo (*forward*) ou para cima (*reverse*). (HART et al., 2007).

Quadro 2 Open reading frames (ORFs) codificados pelo OvHV-2 (BJ1035) e suas respectivas funções (HART et al., 2007).

Gene block*	OvHV-2 ORF	Strand	Expression†	Start codon‡	Stop codon‡	TATA§	Poly(A)§	Length (aa)	AIHV-1 id (%)	HVS id (%)	Description¶
I	Ov2	-	+	SA:2569	2159		1326	186	56	NA	Basic leucine-zipper motif; homologue of AIHV-1 A2
	Exon 1	-		2813	SD:2664	2840					
	Exon 2	+		3576	SD:3761	3520					
	Ov2.5	+		SA:3844	SD:3903						
	Exon 3	+		SA:3985	SD:4137						
	Exon 4	+		SA:4229	SD:4294						
	Exon 5	+	+	SA:4375	4458		4503	182	NA	NA	vIL-10
	Ov3	+	+	4801	6177	4641	6755	458	50	NA	Semaphorin; homologue of AIHV-1 A3
	Ov3.5	+	+	6911	7402	6843	7432	163	NA	NA	Signal peptide
	ORF03	+	+	7654	11739	7609	11759	1361	52	28	FGARAT; tegument protein
Ov4.5	+	+	11795	12433	11758	12429	212	50	NA	vBcl-2; homologue of EBV BALF1	
I	ORF06	+		12575	15964	12501	16156	1129	79	50	Single-stranded DNA-binding protein
	ORF07	+		16039	18087	15627		682	65	41	Subunit of terminase
	ORF08	+		18071	20662	17905	20763	863	76	44	Glycoprotein B
	ORF09	+		20857	23853	20718	24031	998	75	56	DNA polymerase, catalytic subunit
	Ov5	+	+	24135	25388	23830		417	49	NA	GPCR; homologue of AIHV-1 A5 and EBV BALF1
	ORF10	+		25108	26328	24887		406	56	21	Non-essential for replication
	ORF11	+		26330	27562	26103	27600	410	56	30	Virion component; non-essential for replication
	ORF17	-		38557	36899	38646	36852	552	50	34	Maturation protease; capsid protein
	ORF17.5	-		37726	36899	37873	36852	275	42	29	Major scaffold protein
II	ORF18	+		38514	39344	38350		276	68	45	
	ORF19	-		40997	39318	41111	39299	559	74	41	Tegument protein; putative portal-capping protein
	ORF20	-		41538	40786	41641		250	61	41	Nuclear protein
	ORF21	+		41537	43246	41233		569	47	29	Thymidine kinase
	ORF22	+		43267	45519	43165	45522	750	63	27	Glycoprotein H
	ORF23	-		46714	45512	46920	45463	400	58	34	Tegument protein
	ORF24	-		48909	46720	49012	46702	729	70	41	
	ORF25	+		48908	53011	48789		1367	81	57	Major capsid protein forming pentons and hexons
	ORF26	+		53077	53991	52980		304	83	48	Capsid triplex protein
	ORF27	+		53997	54878	53945	54955	293	51	28	Glycoprotein; involved in cell-cell spread

Quadro 2 Continuação

Gene block*	OvHV-2 ORF	Strand	Expression†	Start codon‡	Stop codon‡	TATA§	Poly(A)§	Length (aa)	AIHV-1 id (%)	HVS id (%)	Description¶
	ORF29	-		SA:56110	54965		54969	687	82	58	ATPase subunit of terminase
	ORF30	+		56128	56379	56021	56738	83	57	33	
	ORF31	+		56301	56975			224	67	41	Essential for replication
	ORF32	+		56924	58354	56868		476	48	25	Nuclear capsid localization
	ORF33	+		58344	59363	58288	59679	339	52	37	Tegument protein
	ORF29	-		60270	SD:59353	60410					
	ORF34	+		60269	61282			337	63	37	
	ORF35	+		61260	61721	60970		153	59	29	Tegument protein
	ORF36	+		61615	62937		64175	440	55	33	Protein kinase
	ORF37	+		62921	64378	62729		485	79	42	Alkaline exonuclease
	ORF38	+		64333	64518	64224	64525	61	49	47	Myristylated tegument protein; role in egress
	ORF39	-		65790	64564	65868	64568	408	80	44	Glycoprotein M
	ORF40	+		65834	SD:67180	65773					
	ORF40	+		SA:67304	67861		67956	634	48	26	Complexed with helicase-primase
	ORF42	-		68631	67858	68713	67845	257	64	3	Tegument protein
	ORF43	-		70291	68603	70642		562	83	54	Capsid portal protein
	ORF44	+		70146	72638	70084	72637	830	78	55	Helicase
	ORF45	-		73479	72694		72684	261	37	22	Nuclear phosphoprotein; essential for replication
	ORF46	-		74267	73512	74361		251	71	56	Uracil DNA glycosylase
	ORF47	-		74706	74251	74752	73839	151	45	28	Glycoprotein L
	ORF48	-		76101	74761	76148		446	41	25	
	ORF50	+		76272	SD:76328	75986					
	ORF49	-		77341	76367	77394	76365	324	NA	23	Transcriptional control; EBV BRRF1 homologue
	ORF50	+	+	SA:77379	79043		79196	573	36	22	Transcriptional control; Rta
	Ov6	+		79355	SD:79879	79287					
	Ov6	+		SA:79989	SD:80093						
	Ov6	+	+	SA:80189	80329		80384	256	28	NA	Leucine-zipper motif; homologue of AIHV-1 A6
	Ov7	+	+	80901	81266	80846	81338	121	60	NA	Putative glycoprotein; homologue of AIHV-1 A7
	Ov8	+		81538	SD:82756						
	Ov8	+	+	SA:83704	83906		83906	473	41	NA	Putative glycoprotein; homologue of AIHV-1 A8
	ORF52	-		84375	83965	84433	83953	136	45	26	

III

Quadro 2 Continuação

Gene block*	OvHV-2 ORF	Strand	Expression†	Start codon‡	Stop codon‡	TATA§	Poly(A)§	Length (aa)	AIHV-1 id (%)	HVS id (%)	Description¶
	ORF53	-		84765	84457	84821	84461	102	51	35	Glycoprotein N
	ORF54	+		84834	85715	84766	85750	293	57	36	dUTPase
	ORF55	-		86415	85759	86479	85723	218	74	43	
	ORF56	+		86414	88927		89052	837	67	43	Primase
	ORF57 Exon 1	+		89060	SD:89111	88953		433	51	23	
	ORF57 Exon 2	+		SA:89214	90463		90485				Post-transcriptional regulator; Mta
	ORF58	-	+	91970	90915		90929	351	60	26	Membrane-spanning; complexed with ORF27
	ORF59	-	+	93146	91977	93241		389	63	33	Processivity factor of DNA polymerase
	ORF60	-		94195	93278	94304	93660	305	80	57	Ribonucleotide reductase (small subunit)
IV	ORF61	-		96604	94247	96794	94202	785	71	51	Ribonucleotide reductase (large subunit)
	ORF62	-		97642	96635	97797		335	63	32	Capsid triplex protein
	ORF63	+		97641	100484	97494	100947	947	61	27	Tegument protein
	ORF64	+		100489	108363	100391	108392	2624	50	24	Large tegument protein
	ORF65	-		109063	108428	109170	108234	211	41		Capsid protein on hexon tips
	ORF66	-		110427	109120	110574	109121	435	60	36	
	ORF67	-		111122	110346	111277		258	68	51	Capsid docking protein on nuclear lamina
	ORF67a	-		111384	111130	111482		84	69	48	Interacts with terminase
	ORF68	+		111604	113022	111534	113134	472	61	39	Nuclear capsid localization
	ORF69	+		113029	113883	112941	113844	284	74	44	Capsid docking protein on nuclear lamina
	Ov8.5	+	+	117777	118949	117677	118969	390	NA	NA	Proline-rich
	ORF73	-	+	120533	119046	120686	118971	495	43		LANA homologue; episomal maintenance
	ORF75	-		125054	121104	125099	121023	1316	58	29	FGARAT; virion tegument protein
	Ov9	+	+	125436	126056	125375	126207	206	50		vBd-2
	Ov10	-	+	129326	127920	129392	127708	468	22		Putative nuclear protein; homologue of AIHV-1 A10

*Blocks of conserved core herpesvirus genes are separated by lines and indicated by Roman numerals.

†Indication of expression of mRNA specific for this ORF in OvHV-2-infected cells either in this study or others (Coulter & Reid, 2002; Thonur *et al.*, 2006).

‡The position of the respective ORF on the genome is given from the first nucleotide of the first methionine codon or splice acceptor (SA) to the last nucleotide of the stop codon or splice donor (SD).

§The first nucleotides of putative TATA boxes and polyadenylation signals (AATAAA or ATTAAA) are given.

||Percentage identity of herpesvirus ORFs to the respective OvHV-2 ORF (calculated with the BLAST algorithm with default parameters).

¶Possible functions for the OvHV-2 proteins are deduced from the homologous ORFs described in other herpesviruses.

A análise do genoma de AIHV-1 e OvHV-2 mostram um certo grau de identidade (62%) que se estende pela maior parte dos ORFs (figura 4), no entanto eles diferem na região ORF75, com identidade de apenas 58% (HART et al., 2007).

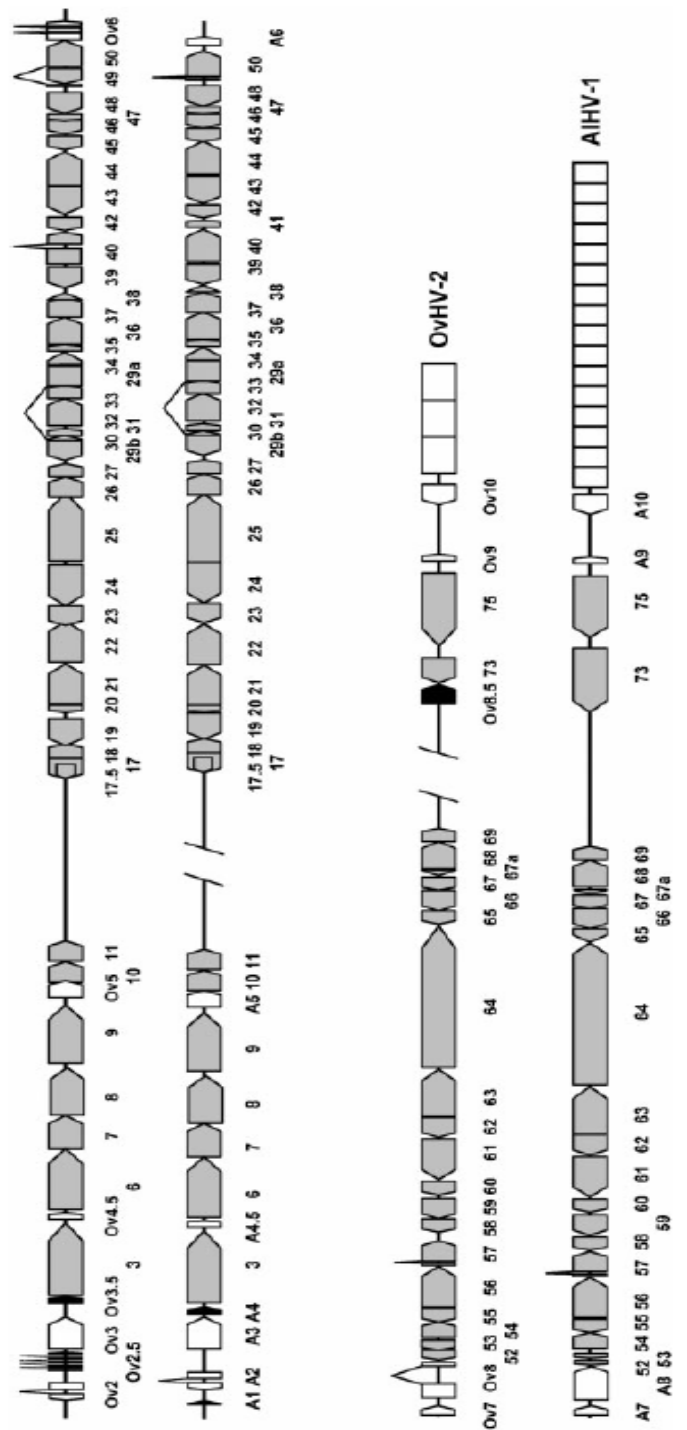


Figura 4: Comparação da organização do genoma do OvHV-2 (acima) e AIHV-2 (abaixo). ORFs são representados por setas largas da seguinte forma: sombreado de cinza estão os ORFs comuns a herpesvirus, sem sobreposição ORFs encontrados apenas em OvHV-2 e AIHV-2, sombreamento preto ORFs exclusivos para OvHV-2 ou AIHV-2 (HART et al, 2007).

O sequenciamento de DNA é uma série de processos bioquímicos que tem por objetivo determinar a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA. Existem vários métodos disponíveis, sendo que cada um apresenta vantagens e desvantagens (WALKER; RAPLEY, 2009).

Um dos mais utilizados é o “método didesoxi”, conhecido também como “terminadores de cadeia” ou “método de Sanger”. Tem como base identificar, continuamente e sequencialmente durante o processo, o último nucleotídeo incorporado na extremidade de alongamento da cadeia. Para isso, há a incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em amplificação, tendo como molde o DNA alvo. Quando os ddNTPs são adicionados, como estes não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3’ necessário para a ligação do próximo dNTP, a extensão da cadeia é interrompida. Esses ddNTPs são marcados especificamente podendo ser identificado o nucleotídeo (GLICK et al., 2009).

Existem duas modalidades de sequenciamento: o manual e o automático, sendo que o automático é o mais utilizado hoje em dia.

O sequenciamento automático, utilizado neste estudo, é o de eletroforese em capilar (ABI3500XL *Applied Biosystem*), onde os ddNTPs possuem marcação com fluorescência.

A reação de sequenciamento ocorre em termociclador e é caracterizada por várias etapas ou ciclos em diferentes temperaturas, repetidos por várias vezes por um determinado período de tempo.

Após a reação de sequenciamento, os produtos são purificados, para a remoção dos nucleotídeos não incorporados e demais reagentes, para não interferir na leitura quando submetidos e encaminha-se ao sequenciador automático, que tem por objetivo a eletroforese. Neste, os fragmentos marcados com fluorescência migram ordenadamente no interior dos capilares e, à medida que são excitados por um feixe de *laser*, emitem luz em diferentes comprimentos de onda, que são detectados por um fotomultiplicador. Em seguida, essa informação é transmitida ao computador e processada para que ao final da corrida, os dados possam ser recuperados em formato de eletroferograma ou de texto (fasta), seguindo-se da análise de bioinformática da sequência obtida (GLICK et al., 2009)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada a análise retrospectiva de 290 amostras de sistema nervoso central de bovinos, sendo que as mesmas amostras encontravam-se *in natura* e emblocadas em parafina, com diagnóstico clínico de transtorno neurológico e/ou com sintomas vesiculares. Esse histórico clínico neurológico foi avaliado seguindo critérios clínicos definidos no Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN-Anexo 4), utilizado no envio de amostras para testes laboratoriais e levantamento de informações, para apoiar a investigação e avaliação clínica e epidemiológica de suspeitas ou focos de síndromes neurológicas. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Vírus de Bovídeos, Laboratório de Anatomia Patológica e Laboratório de Raiva e Encefalites do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, por veterinários oficiais e autônomos que atuam no campo, para o diagnóstico diferencial de síndrome neurológica/vesicular, provenientes de diferentes regiões brasileiras. Somente amostras de sistema nervoso central negativas para o vírus rábico foram utilizadas neste estudo. Do total das amostras analisadas, 285 são do período de janeiro de 2012 a março de 2014 e, para padronização e validação dos métodos moleculares, cinco casos confirmados de FCM pelo exame histopatológico, sendo um caso de 2007 e quatro de 2009.

4.2 Análise histológica

Para a visualização das lesões histológicas microscópicas do vírus nos tecidos afetados, foram feitas lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina (HE).

4.2.1 Desidratação, diafanização e emblocagem em parafina dos tecidos

Após a fixação dos tecidos em formalina 10% tamponada, os materiais foram cortados em fragmentos menores e depositados em cassetes histológicos. Os materiais cortados permaneceram *overnight* em formol 10% tamponado. Os órgãos foram submetidos a um protocolo de soluções de álcool etílico em concentrações crescentes para

desidratação, diafanização pelo xilol e embebição em parafina (PROPHET et al., 1995). Por fim, foram emblocados em parafina e devidamente identificados.

4.2.2 Preparo das lâminas histológicas para coloração por H.E.

O tecido emblocado em parafina foi cortado em micrótomo (5µm de espessura), estendido em banho-maria (60°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com albumina, para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina. Em seguida, a lâmina foi colocada em estufa 60°C *overnight* para desparafinização parcial, e posteriormente submetida, em temperatura ambiente, a um protocolo de desparafinização completa (xilol), hidratação em álcoois e água, coloração pela hematoxilina e eosina, desidratação em álcoois e diafanização em xilol (PROPHET et al., 1995).

Para a montagem da lâmina e lamínula foi empregada a resina sintética Entellan (MERCK). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum.

4.3 Análise Molecular

Para a análise molecular do vírus causador da FCM foram realizadas as técnicas PCR qualitativa, qPCR e sequenciamento das amostras.

4.3.1 Extração do Ácido Nucleico de material *in natura*

Para a extração do DNA do material *in natura*, foi comparado o desempenho de três protocolos de extração, para avaliação do mais eficiente para OvHV-2, tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três dias diferentes para garantir a repetibilidade e reprodutibilidade da prova. O material utilizado foi um sistema nervoso central sabidamente positivo para o OvHV-2 pelo histopatológico, sendo que o animal infectou-se naturalmente, e um sabidamente negativo. Todos os extraídos foram submetidos a PCR qualitativa, sob as mesmas condições de amplificação. Os protocolos de extração testados foram: DNAzol® (Invitrogen), Trizol® (Invitrogen) e Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega).

4.3.1.1 DNAzol®

Pelo protocolo do DNAzol® (Invitrogen) adicionou-se 100µL da amostra em 1mL de DNAzol; homogenizou-se por inversão e centrifugou-se a 10.000 x g por 10 minutos; transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo com o auxílio da micropipeta; adicionou-se ao sobrenadante 500µL de etanol puro gelado;homogeneizou-se por inversão até formar grumos brancos (1-3 minutos em temperatura ambiente); centrifugou-se a 4.000 x g por 2 minutos à 4°C para formar o *pellet* de DNA; descartou-se o sobrenadante por inversão; adicionou-se ao *pellet* 850µL de etanol 75% gelado e inverteu-se o tubo para lavagem do *pellet*; centrifugou-se a 4.000 x g por 2 minutos; retirou-se todo o etanol com o auxílio da micropipeta; secou-se o *pellet* e ressuspendeu-se em 100µL de NaOH 8mM, passando o pelo *tip*; neutralizou-se o pH com tampão Hepes 1M com auxílio da fita da pH; o extraído foi estocado a -20°C até o uso.

4.3.1.2 Trizol®

Pelo protocolo do Trizol® (Invitrogen) misturou-se 50-150mg do tecido a 750µL de tampão de lise (Trizol® Reagent Invitrogen) no cadinho com auxílio do pistilo e transferiu-se ao microtubo; incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente; adicionou-se 200µL de clorofórmio e homogeneizou-se em vórtex por 30 segundos; incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente; centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C; descartou-se a fase aquosa com auxílio de uma micropipeta tomando cuidado para não pegar a fase intermediária; acrescentou-se 300µL de etanol 100% para precipitação do DNA que foi homogeneizado por inversão; incubou-se a temperatura ambiente por 3 minutos; centrifugou-se novamente a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C para precipitação do DNA; desprezou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1mL da solução de 0,1M Citrato de Sódio em 10% de etanol (pH 8,5) ao *pellet* e homogeneizou por inversão; incubou-se a temperatura ambiente por 30 minutos; centrifugou-se a 2.000 x g por 5 minutos; descartou-se o sobrenadante cuidadosamente com ajuda de uma micropipeta; procedeu-se uma nova lavagem com 0,1M de Citrato de Sódio em 10% de etanol; adicionou-se 2mL de etanol 75% e homogeneizou-se por inversão; incubou se a temperatura ambiente por 20 minutos; centrifugou-se 2.000 x g por 5 minutos 4°C; descartou-se o sobrenadante e inverteu-se o tubo sobre papel absorvente para secar o *pellet*; ressuspendeu-se o DNA em 150µL de 0,8mM NaOH; centrifugou-se a 4°C, 12.000 x g por 10 minutos para remover qualquer

substância insolúvel; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5mL; ajustou-se o pH para 7-8 com tampão HEPES, utilizando fita de pH; o extraído foi estocado a -20°C até o uso.

4.3.1.3 Wizard® Genomic DNA Purification

Pelo Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega) adicionou-se 600µL de *Nuclei Lysis Solution* gelado à 10-20mg da amostra macerada e homogeneizou-se por 10 segundos no vórtex; incubou-se o lisado a 65°C por 30 minutos em Termomix (Eppendorf®); esperou-se o lisado atingir temperatura ambiente e adicionou-se 200µL de *Protein Precipitation Solution* e homogeneizou-se no vórtex por 20 segundos; incubou-se em gelo por 5 minutos; centrifugou-se por 4 minutos a 13.000 x g; removeu-se o sobrenadante e transferiu-se para um novo microtubo contendo 600µL de isopropanol a temperatura ambiente; homogeneizou-se gentilmente por inversão; centrifugou-se por 1 minuto a 13.000 x g à temperatura ambiente; descartou-se o sobrenadante; adicionou-se 600µL de etanol 75% à temperatura ambiente; homogeneizou-se gentilmente por inversão; centrifugou-se por 1 minuto a 13.000 x g à temperatura ambiente; desprezou-se o sobrenadante e secou o *pellet*; adicionou-se 100µL de *DNA Rehydration Solution* e incubou-se por 1 hora a 65°C em Termomix (Eppendorf®); o extraído foi estocado à -20°C até o uso.

4.3.2 Extração Ácido nucleico de material parafinado

Para a extração do DNA do material parafinado foram comparados o desempenho de sete protocolos de extração para avaliação do mais eficiente para o vírus da FCM (OvHV-2) tanto qualitativamente quanto quantitativamente. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três dias diferentes para garantir a repetibilidade e reprodutibilidade da prova. O material utilizado foi um sistema nervoso central sabidamente positivo para o vírus da FCM (com lesões histológicas características), sendo que o animal infectou-se naturalmente, e um sabidamente negativo. Todos os extraídos foram submetidos a PCR qualitativa sob as mesmas condições de amplificação. Os protocolos de extração testados foram: NucleoSpin® FFPE DNA (Macharey- Nagel), Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (STRATEC Molecular), innuPREP® DNA Mini Kit (Analytik Jena), QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN), Hight

Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche Molecular Systems, Foster City, CA), e dois protocolos recomendados pela literatura (CHAN et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2003).

4.3.2.1 NucleoSpin® FFPE DNA

Pelo NucleoSpin® FFPE DNA (Macherey- Nagel) adicionou-se cerca de 15mg do material parafinado à 400µL de *Paraffin Dissolver*; incubou-se por 3 minutos a 60°C; homogeneizou-se no vórtex imediatamente (à 60°C) para dissolver a parafina; resfriou-se a amostra até a temperatura ambiente e adicionar 100µL *Buffer BL*; homogeneizou-se no vórtex e centrifugou-se a 11.000 x g por 1 minuto; descartou-se a fase orgânica superior; adicionou-se 10µL de solução de Proteinase K; incubou-se em temperatura ambiente por 3h para a lise do tecido da amostra (como houve residual tecido não lisado visível depois da 3h adicionou mais 10µL de solução proteinase K e continuou digestão *overnight*); adicionou-se 100µL de *Decrosslink Buffer D-Link*; incubou-se a 90°C por exatamente 30 minutos; resfriou-se a temperatura ambiente; adicionou-se 200µL de etanol (96-100%); pipetou-se toda a fase aquosa (aproximadamente 450µL) no *NucleoSpin® FFPE DNA Column*; centrifugou-se a 2.000 x g por 30s; descartou-se o tubo coletor e colocou a coluna em um novo tubo coletor de 2mL; adicionou 400µL de *Buffer B5* na coluna; centrifugou-se a 11.000 x g por 30s; retirou-se a coluna e passou a para novo tubo de 2mL; adicionou-se 400µL de *Buffer B5* na coluna; centrifugou-se a 11.000 x g por 2min para secar a membrana; retirou-se a coluna e colocou a em um tubo de 1,5mL; pipetou-se 20µL de *Buffer BE* diretamente no centro da membrana de sílica da coluna e centrifugou-se a 11.000 x g por 30s; o extraído foi estocado a -20°C até a hora do uso.

4.3.2.2 Invisorb® Spin Tissue Mini Kit

Pelo Invisorb® Spin Tissue Mini Kit Kit (STRATEC Molecular), adicionou-se cerca de 15mg do material parafinado à 1mL de xilol e homogeneizou-se no vórtex até a dissolução da parafina; centrifugou-se por 2 minutos à 14.000 x g até a formação do *pellet*, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se a lavagem com xilol mais uma vez; ao *pellet* adicionou-se 500µL de etanol 100% e homogeneizou-se no vórtex; centrifugou-se por 2 minutos à 14.000 x g até a formação do *pellet*; descartou-se o sobrenadante e incubou-se a 52°C em Termomix (Eppendorf®) para a evaporação do etanol residual; adicionou-se 400µL de *Lysis*

Buffer G e 40µL de Proteinase K e homogeneizou-se no vórtex; incubou-se a 52°C em Termomix (Eppendorf®) *overnight*, centrifugou-se por 2 minutos à 14.000 x g e transferiu-se o sobrenadante a um novo tubo; adicionou-se 200µL de *Binding Buffer T* e homogeneizou-se no vórtex por 10 segundos; transferiu-se a suspensão para o *Spin Filter* em um *Receiver Tube*; centrifugou-se a 13.000 x g por 2 minutos; descartou-se o filtrado e colocou-se o *Spin Filter* em um *Receiver Tube*; adicionou-se 550µL de *Wash Buffer* e centrifugou-se por 13.000 x g por 1 minuto; descartou-se o filtrado e repetiu-se a lavagem com *Wash Buffer* uma vez; descartou-se o filtrado; centrifugou-se por 2 minutos a 13.000 x g para remoção do etanol residual; colocou-se o *Spin Filter* em um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 50µL de *Elution Buffer D*; incubou-se por 3 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se por 2 minutos a 8.500 x g; o extraído foi estocado a -20°C até a hora do uso.

4.3.2.3 innuPREP® DNA Mini Kit

Pelo protocolo innuPREP® DNA Mini Kit (Analytik Jena), acrescentou-se 1mL de xilol a aproximadamente 15mg de tecido parafinado e homogeneizou-se no vórtex até a dissolução da parafina; centrifugou-se a 14.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante; acrescentou-se 1 mL de etanol 100% e agitou-se no vórtex; centrifugou-se a 14.000 x g por 3 minutos e descartou-se o sobrenadante; repetiu-se a lavagem com etanol uma vez; incubou-se o *pellet* a 37°C com a tampa aberta pó 15 minutos para evaporar o etanol residual; adicionou-se 400µL de *Lysis Solution TLS* e 25µL de proteinase K; agitou-se em vórtex e incubou-se a 50°C por 2 horas; incubou-se o lisado por 60 minutos a 90°C; Adicionou-se 400µL *Binding Solution TBS* ao lisado e agitou-se no vortex por 15 segundos; aplicou-se o lisado no *Spin Filter* em um tubo *Receiver Tube* de 2mL; centrifugou-se a 10.000 x g por 2 minutos; descartou-se o filtrado; adicionou-se 500µL de *Washing Solution MS* e centrifugou-se por 10.000 x g por um minuto; descartou-se o filtrado; adicionou-se 750µL *Washing Solution MS*; centrifugou-se a 10.000 x g por 1 minuto; descartou-se o sobrenadante; centrifugou-se a 14.000 x g por 2 minutos para remover os traços de etanol; adicionou-se 50µL de *Elution Buffer*; incubou-se por um minuto em temperatura ambiente; centrifugou-se a 6.000 x g por 1 minuto; repassou-se o filtrado pelo filtro para melhor eluição do DNA; o extraído foi estocado a -20°C até a hora do uso.

4.3.2.4 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Pelo protocolo QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) adicionou-se 1mL de xilol a 8 secções de 5-10µm do material parafinado. Agitou-se no vórtex por 10 segundos. Centrifugou-se por 2 minutos a temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante e repetiu-se esses passos por mais duas vezes. Adicionou-se ao *pellet* 1mL de etanol (96-100%) e agitou-se no vórtex. Centrifugou-se em rápida velocidade por 2 minutos a temperatura ambiente. Removeu-se o sobrenadante e secou-se o *pellet* em temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o *pellet* em 80µL de *buffer ATL* e adicionou-se 20µL de proteinase K. Agitou-se no vórtex e incubou-se a 56°C até que a amostra estivesse totalmente lisada (*overnight*). Posteriormente incubou-se a 90°C por 1h. Adicionou-se 200µL de *buffer AL* ao lisado e agitou-se no vórtex. Adicionou-se 200µL de etanol (96-100%) e agitou-se novamente no vórtex. Transferiu-se todo o conteúdo do tubo ao *QIAamp MinElute column* em conjunto com um tubo coletor e centrifugou-se a 600 x g por 1min. Trocou-se o tubo coletor e adicionou-se 500µL de *buffer AW2* e centrifugou-se a 6.000 x g por 1min. Descartou-se o conteúdo do tubo coletor e centrifugou-se novamente a 20.000 x g por 3min, para secar a membrana. Acoplou-se o *QIAamp MinElute column* a um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 30µL de *buffer ATE*. Incubou-se por 1 minuto, em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 20.000 x g por 1min. Repassou-se o filtrado pelo filtro para melhor eluição do DNA; o extraído foi estocado a -20°C até a hora do uso.

4.3.2.5 Hight Pure FFPE DNA Isolation Kit

Pelo Hight Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche Molecular Systems, Foster City, CA), adicionou-se 800µL de xilol em uma secção de, no máximo, 10µm do material e incubou-se por 5 min agitando-se no vórtex de tempos em tempos. Adicionou-se 400µL de etanol 100% e homogeneizou-se no vórtex. Centrifugou-se a 16.000 x g por 2 min. descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1mL de etanol 100% e homogeneizou-se no vórtex. Centrifugou-se a 16.000 x g por 2 min. e descartou-se o sobrenadante. Secou-se o *pellet* adicionou-se 70µL de proteinase K e 180µL de tampão *Tissue Lysis Buffer*, homogeneizou-se no vórtex e incubou-se à 56°C (600 rpm) por 3h. Posteriormente incubou-se à 90°C (600 rpm) por 60 min. Adicionou-se ao lisado 200µL de *DNA Binding Buffer* ; Incubou-se por 10 min. à temperatura ambiente. Adicionou-se 100µL de isopropanol. Transferiu-se para *Hight Pure Filter Tube* em um *Hight Pure Collection Tube* e centrifugou-se a 8.000 x g por 1 min.

Adicionou-se 500µL de *Wash Buffer I* e centrifugou-se a 8.000 x g por 1 min. Adicionou-se 500µL de *Wash Buffer III* centrifugou-se a 8.000 x g por 1 min. Repetiu-se esse último passo. Centrifugou-se novamente, para secar o filtro, a 16.000 x g por 1 min. Transferiu-se o filtro para um microtubo de 1,5mL e adicionou-se 30µL de *Elution Buffer* e centrifugou-se a 8.000 x g por 1 min. O extraído foi estocado a -20°C até a hora do uso

4.3.2.6 Protocolo proposto por CHAN e colaboradores (2001)

Pelo protocolo proposto por Chan et al. (2001) foi realizada em cortes sequenciais de 4µm sendo que em cada microtubo, utilizado na extração foram colocados de 5 a 9 fragmentos de 4µm, total de 20µm e 36 µm em cada microtubo; adicionou-se 1mL de xilol aos cortes e submeteu-se a agitação contínua de 1.000 x g por 20 minutos a 65°C em termomix (*Eppendorf*[®]); centrifugou-se a 10.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente e descartou-se o sobrenadante; repetiram-se esses passos cinco vezes; adicionou-se 1mL de etanol puro (etanol 100%) e submeteu-se à agitação contínua de 1.000 rpm por 5 minutos a 25°C em termomix; centrifugou-se a 10.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente e descartou o sobrenadante; repetiram-se esses dois últimos passo só que com etanol 90 e 75%; secou-se em por 2 minutos a 56°C; adicionou-se 500µL do tampão de lise (Tris-HCL 10mM; NaCl 100mM; EDTA 25mM; SDS 1%; proteinase K 10 µg/ µL); incubou-se *overnight* a 55°C agitando em intervalos de 15 minutos; adicionou-se 250µL de fenol e 250 µl de clorofórmio; agitou-se por 15 segundos; centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos; recuperou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de isopropanol; incubou-se a -20°C por duas horas; centrifugou-se a 12.000 xg por 30 minutos; desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de etanol 75%; homogeneizou-se suavemente e centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos; desprezou-se o sobrenadante; secou-se o *pellet*; acrescentou-se 30 µl de TE; o extraído foi estocado a -20°C até a hora do uso.

4.3.2.7 Protocolo proposto por Nascimento e colaboradores (2003)

Pelo protocolo sugerido por Nascimento et al. (2003) 30mg a 40mg de material foram submetidos por duas vezes, a um banho de 1.000µL de xilol por 30 minutos a 65°C, centrifugado a 14.000 x g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Após a desparafinização retirou-se todo o xilol com um banho de 1.000µL de etanol 100% e outro

de 1.000µL de etanol a 95%, ambos à temperatura ambiente, por 1 minuto. Após esta etapa, o material foi reidratado com dois banhos de 1.000µL de etanol a 70% e dois banhos de água deionizada. Em cada uma destas etapas o material deverá ser centrifugado a 14.000 x g por 5 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Adicionou-se 600µL de solução de lise (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega) e incubou-se a 65°C por 60 minutos; adicionou-se proteinase K (10µg/µL) numa proporção de 3,5µL da solução para cada 1mg de material parafinado; incubou-se *overnight* a 60°C; adicionou-se 200µL de *Protein Precipitation Solution* (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega) homogeneizou-se no vórtex por 20 segundos; incubou-se em gelo por 5 minutos; centrifugou-se por 4 minutos a 13.000 x g; removeu-se o sobrenadante e transferiu-se para um novo microtubo contendo 600µL de isopropanol em temperatura ambiente; homogeneizou-se gentilmente por inversão; centrifugou-se por 1 minuto a 13.000 x g em temperatura ambiente; descartou-se o sobrenadante; adicionou-se 600µL de Etanol 75% gelado; homogeneizou-se gentilmente por inversão; centrifugou-se por 1 minuto a 13.000 x g em temperatura ambiente; desprezou-se o sobrenadante e secou o *pellet*; adicionou-se 30µL de *DNA Rehydration Solution* (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega) e incubou-se por 1 hora a 65°C em Termomix (Eppendorf®); o extraído foi estocado à -20°C até a hora do uso.

4.3.3 Dosagem do Ácido Nucleico

Após a extração, foi dosado o ácido nucleico por espectrofotometria (Biofotômetro – Eppendorf®). Para uma extração válida a razão entre as absorbâncias 260/280 deve estar entre 1.8 e 2.0 (SAMBROOK, 2001). Para a dosagem da amostra padrão e suas diluições, para a validação da PCR qualitativa e qPCR, foi utilizado o QuantiFluor® dsDNA System de acordo com o manual do fabricante.

4.3.4 Determinação da amostra controle positivo padrão

Para padronização da PCR qualitativa e PCR quantitativa, utilizou-se como padrão uma amostra recebida pelo Laboratório de Víroses de Bovídeos e Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Biológico de São Paulo, com lesões características para FCM (inclusive vasculite necrosante e fibrinóide generalizada características da FCM). Esta amostra (*in natura*) foi amplificada pela PCR qualitativa (utilizando os *primers* do quadro 3),

submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5%, visualizadas no transluminador e o tamanho do fragmento observado correspondeu aos 422 pb esperado. Em seguida, as bandas presentes no gel foram cortadas com auxílio de um bisturi. O material foi purificado utilizando-se o Kit Wizard[®]SV gel and PCR Clean Up System (Promega), segundo as recomendações do fabricante, e armazenados a -20°C até a sua utilização.

Os produtos purificados da PCR foram sequenciados utilizando a metodologia descrita no capítulo 4.2.9 deste trabalho. A sequência viral obtida foi verificada no BLAST.

Para determinar a sensibilidade analítica da reação, a concentração do DNA viral deste purificado foi verificada utilizando o QuantiFluor[®] dsDNA System, de acordo com o manual do fabricante. Como o valor obtido está em massa e para verificar a sensibilidade analítica da PCR é necessário verificar o número de cópias por microlitro, faz-se necessário a conversão deste valor. Para isso utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Número de cópias / } \mu\text{L} = \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ (moléculas / mole)} \times \text{DNA (xg / } \mu\text{L)}}{\text{Número de pares de base} \times 660 \text{ daltons}}$$

Onde,

6.022×10^{23} (moléculas/mole): número de Avogadro

660 Da: peso médio de um par de bases

Também disponível online em <http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>.

Foram feitas diluições seriadas deste purificado, tido como padrão neste estudo, da seguinte forma:

O purificado foi diluído 50X (10 μ L do purificado + 490 μ L de *Nuclease-free water*). A partir deste, foram feitas diluições seriadas na base 10 (5 μ L do purificado + 45 μ L do diluente) obtendo-se as seguintes diluições: 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10¹ e 10⁰.

Inicialmente estas diluições foram feitas em *Nuclease-free water* e quantificadas utilizando o QuantiFluor[®] dsDNA System, de acordo com o manual do fabricante, para verificar o número de cópias de DNA viral presente em cada diluição.

Desta forma, estas diluições obtidas foram empregadas como padrão para a avaliação da sensibilidade analítica da PCR qualitativa e qPCR.

Posteriormente, essas mesmas diluições foram feitas em extraídos de SNC bovino sabidamente negativos para o OvHV-2, para verificar possíveis inibidores ou algum outro fator que diminuísse a sensibilidade analítica da PCR.

4.3.5 Padronização da PCR qualitativa

Para a padronização da PCR qualitativa, foi analisada a sensibilidade analítica da PCR e realizados vários ajustes e testes na programação da reação para aperfeiçoá-la.

Inicialmente, foi feito gradiente de temperatura, tanto da primeira como da segunda amplificação. Levando-se em conta que a temperatura de *Melting* do *primer* 556 é 61,8°C e do *primer* 755 é 56,6°C foi feito gradiente de temperatura de 60°C a 67°C e analisado em gel de agarose 1,5%

Para a segunda amplificação, utilizou-se o produto da primeira amplificação que teve maior intensidade de banda no primeiro gradiente, e fez-se um segundo gradiente de temperatura de 65°C a 70°C levando-se em conta que a temperatura de *Melting* do *primer* 556 é 61,8°C e 555 é 66,9°C.

Submeteu-se então as diluições em *Nuclease-free water* do vírus padrão a temperatura e ciclagem padrão obtida em três reações feitas em três dias diferentes.

Posteriormente, submeteu-se então as diluições em extraído do SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do vírus padrão em três reações feitas em três dias.

Para realizar a PCR qualitativa utilizando somente os *primers* 556 e 555 (da segunda amplificação) foi feito um gradiente de 65°C a 70°C, utilizando as diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do 10^4 a 10^1 .

Assim sendo obteve-se as condições de temperatura e ciclagem padrão para a FCM (OvHV-2).

Para a ampliação do ácido nucleico pela PCR convencional (BAXTER et al., 1993; LI et al., 2001; OIE, 2013) utilizou-se PCR Master Mix (Promega) contendo 50units/mL de Taq DNA polymerase em buffer (pH 8,5), 400µL de dATP, 400µL de dGTP, 400µL de dCTP, 400µL de dTTP e 3 mM MgCl₂.

Foram utilizados *primers* que detectam a região ORF75 do genoma do OvHV-2 o qual codifica uma proteína do tegumento viral altamente conservada. As sequências dos *primers* foram analisadas no BLAST, e obtiveram 100% de homologia com o OvHV-2. A sequência e posição dos *primers* estão indicados no quadro 3.

Quadro 3: Sequência dos *primers* da PCR qualitativa e localização da região de hibridação. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência do GenBank (n. acesso DQ198083.1)

Nome	Autor	Sequência	Região de Hibridização
FCM 556	Baxter et al., (1993)	5'-GTCTGGGGTATATGAATCCAGATGGCTCTC-3'.	121536 pb- 121507 pb
FCM 755		5'-AAGATAAGCACCCAGTTATGCATCTGATAAA-3'.	121115 pb – 121144 pb
FCM 555		5'-TTCTGGGGTAGTGGCGAGCGAAGGCTTC-3'.	121301 pb- 121328 pb

Os *primers* para a PCR primária foram 556 e 755 que amplifica um fragmento de DNA de 422 pares de base (pb) e os primers 556 e 555 na reação secundária, que amplifica um fragmento de DNA de 238 pb.

Os 25µL do *mix* da primeira amplificação foram compostos por 12,5µL de PCR Master mix (Promega); 1,0µL do *primer* 556 a 10pmol/µL; 1,0µL do *primer* 775 a 10pmol/µL; 8,0µL de *Nuclease- free water* e 2,5µL do extraído. Os 25µL do *mix* da segunda amplificação foram compostos por 12,5µL de PCR Master Mix (Promega); 1,0µL do *primer* 556 a 10pmol/µL; 1,0µL do *primer* 555 a 10pmol/µL; 8,5µL de *Nuclease- free water* e 2,0µL do produto da primeira amplificação.

As condições térmicas de ciclagem e temperatura para a primeira amplificação estão no quadro 4.

Quadro 4 Condições de ciclagem e temperatura da primeira amplificação da PCR qualitativa.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95°C	3 minutos	} 30X
95°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	3 minutos	
4°C	Forever	

As condições térmicas de ciclagem para a segunda amplificação estão no quadro 5.

Quadro 5: Condições de ciclagem e temperatura da segunda amplificação da PCR qualitativa.

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
95°C	3 minutos	} 30X
95°C	30 segundos	
67°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	3 minutos	
4°C	Forever	

4.3.6 Análise do amplificado

O amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X, à voltagem constante de 100V por 60 minutos. Para a visualização da banda no gel, corou-se o DNA com GelRed[®] (Biotium) diluído 1:150 em *Nuclease-free water* e tampão de carregamento Loading Dye, Blue (6X) (Thermo Scientific). A visualização foi realizada em transluminador sob luz ultravioleta (320nm).

O tamanho dos fragmentos de DNA foi comparado com um padrão de pares de base apresentando incrementos de 100 pb (DNA *ladder* de 100 pb – Invitrogen[®]). O resultado foi considerado válido quando o controle positivo apresentou uma banda do produto no tamanho correspondente ao do OvHV-2 e negativo quando houve ausência de banda.

4.3.7 Padronização da PCR quantitativa

Para o desenvolvimento da PCR quantitativa, foi utilizado o equipamento Light Cycler 480 (Roche Molecular Systems, Foster City, CA), disponível no Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo.

4.2.7.1 Sistema SYBR® Green

Para padronização da qPCR pelo sistema SYBR® Green, foi verificada a sensibilidade analítica da prova. Para aperfeiçoá-la, foram testadas diversas concentrações dos *primers*, conforme tabela 1.

Tabela 1 Concentrações dos *primers forward* e *reverse* em nM.

		Primer Forward								
Primer Reverse		200	300	400	500	600	700	800	900	1000
	200	200/200	300/200	400/200	500/200	600/200	700/200	800/200	900/200	1000/200
	300	200/300	300/300	400/300	500/300	600/300	700/300	800/300	900/300	1000/300
	400	200/400	300/400	400/400	500/400	600/400	700/400	800/400	900/400	1000/400
	500	200/500	300/500	400/500	500/500	600/500	700/500	800/500	900/500	1000/500
	600	200/600	300/600	400/600	500/600	600/600	700/600	800/600	900/600	1000/600
	700	200/700	300/700	400/700	500/700	600/700	700/700	800/700	900/700	1000/700
	800	200/800	300/800	400/800	500/800	600/800	700/800	800/800	900/800	1000/800
	900	200/900	300/900	400/900	500/900	600/900	700/900	800/900	900/900	1000/900
	100	200/1000	300/1000	400/1000	500/1000	600/1000	700/1000	800/1000	900/1000	1000/1000

Os *primers* utilizados detectam a região ORF75 do genoma do OvHV-2, que codifica uma proteína do tegumento viral altamente conservada. As sequências dos *primers* foram analisadas no BLAST, e obtiveram 100% de homologia com o OvHV-2. A sequência e posição dos *primers* estão indicados no quadro 6.

Quadro 6 : Sequência dos *primers*, localização da região de hibridação e tamanho do amplificado. Localização dos nucleotídeos baseado na sequência do GenBank (n. acesso DQ198083.1)

Nome	Autor	Sequência	Região de hibridização	Fragmento (pb)
oF-OvHV- 2	Hüssy et al., (2001)	5'-TGGTAGGAGCAGGCTACCGT-3'	121348 pb-121367 pb	131 pb
oR-OvHV-2		5'-ATCATGCTGACCCCTTGCA-3'	121478 pb- 121459 pb	

Foi utilizado o kit comercial LightCycler® 480, SYBR Green I Master (Roche Molecular Systems, Foster City, CA), sendo que os 20µL do *mix* foi composto por 6µL de *Water*, PCR-grade; 2,0µL PCR *primer*, 10X conc. (1µL de cada *primer* a 10pmol/µL); 10µL Master Mix, 2X conc. e 2,0µL do DNA extraído. As reações foram feitas em placas

LightCycler® Multiwell 96, White (Roche Molecular Systems, Foster City, CA). As condições térmicas de ciclagem e temperatura estão no quadro 7. Todas as amplificações por este método foram finalizadas com a curva de dissociação *Melting*, para verificar a especificidade e ausência de formações secundárias de dímeros de oligonucleotídeos ou qualquer outro produto inespecífico.

Quadro 7: Condições de ciclagem e temperatura de amplificação pelo sistema SYBR® Green.

Pré-incubação						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
95	None	00:05:00	4,4		1	None
Amplificação						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
95	None	00:00:10	4,4		40	Quantification
60	None	00:00:20	2,2			
72	Single	00:00:06	4,4			
Curva de <i>Melting</i>						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
95	None	00:00:05	4,4		1	Melting curves
65	None	00:01:00	2,2			
97	Continuous		0,11	5		
Resfriamento						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
40	None	00:00:10	1,5		1	None

Determinado a melhor concentrações dos *primers*, submeteu-se então as diluições em *Nuclease-free water* do vírus padrão (10^5 ao 10^0 cópias de DNA/ μ L) e posteriormente as diluições do vírus padrão em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 (10^5 ao 10^0 cópias de DNA/ μ L), conforme item 4.2.4 deste trabalho, para realizar o limiar de detecção da prova.

Posteriormente foram submetidas as amostras sabidamente positivas (pelo histopatológico) e sabidamente negativas, para validação da prova

As amostras foram consideradas positivas quando os valores do Ct da mesma estiverem de acordo com o valor do Ct previamente estabelecido pela curva padrão (limiar de detecção) e se a temperatura de *melting* (T_m) do DNA amplificado corresponde a do DNA padrão.

4.3.7.2 Sistema TaqMan®

Para a padronização da qPCR pelo sistema TaqMan®, foi verificada a sensibilidade analítica da prova. Para aperfeiçoá-la, foram testadas diversas concentrações dos *primers* em conjunto com a *probe*, sendo que inicialmente foram testados as mesmas diluições do *primer* para validar o sistema SYBERGreen® (tabela 1) com a *probe* a 80nM, concentração esta estabelecida por Hüsey et al. (2001). Em segunda etapa, foram testadas as melhores diluições do *primer* em conjunto com diversas diluições da *probe* (tabela 2).

Tabela 2 Concentrações dos *primers forward reverse* e *probe*.

		Diluição <i>Probe</i> (nM)				
		60	70	80	90	100
Diluição <i>primers</i> (nM)	500/500	500/500	500/500	500/500	500/500	500/500
	600/600	600/600	600/600	600/600	600/600	600/600
		60	70	80	90	100
		60	70	80	90	100

Os *primers* utilizados foram os mesmos utilizados para o sistema SYBERGreen® (quadro 5) que detectam a região ORF75 do genoma do OvHV-2 que codifica uma proteína do tegumento viral altamente conservada.

A qPCR foi realizada com base na descrita por Hüsey et al. (2001) sendo que a *probe* (oP-OvHV-2, 5'-TCCACGCCGTCCGCACTGTAAGA-3') foi conjugada ao 6- carboxy-fluorescein (FAM emissão de comprimento de onda, 518nm) na extremidade 5' (*reporter*) e 6-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA emissão comprimento de onda, 582nm) na extremidade 3' (*quecher*).

Foi utilizado o kit comercial LightCycler® 480, Probes Master (Roche Molecular Systems, Foster City, CA), sendo que os 20µL do *mix* foi composto por 5,82µL de *Water*, PCR-grade; 2,18µL PCR *primer*, 10X conc. (1µL de cada *primer* a 10pmol/µL e 0,18µL da *probe* a 10pmol/µL); 10µL Master Mix, 2X conc. e 2,0µL do DNA extraído. As reações foram feitas em placas LightCycler® Multiwell 96, White (Roche Molecular Systems, Foster City, CA). As condições térmicas de ciclagem e temperatura estão no quadro 8.

Quadro 8 Condições de ciclagem e temperatura de amplificação pelo sistema TaqMan.

Pré-incubação						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
95	None	00:05:00	4,4		1	None
Amplificação						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
95	None	00:00:10	4,4		40	Quantification
60	None	00:00:20	2,2			
72	Single	00:00:01	4,4			
Resfriamento						
Target (°C)	Acquisition mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Ciclos	Analysis Mode
40	None	00:00:10	1,5		1	None

Determinado a melhor concentrações dos *primers* e *probe*, submeteu-se então as diluições em *Nuclease-free water* do vírus padrão (10^5 ao 10^0 cópias de DNA/ μ L) e posteriormente as diluições do vírus padrão em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 (10^5 ao 10^0 cópias de DNA/ μ L), conforme item 4.2.4, para realizar o limiar de detecção da prova.

As amostras foram consideradas positivas quando os valores do Ct da mesma estiverem de acordo com o valor do Ct previamente estabelecido pela curva padrão (limiar de detecção).

Posteriormente foram submetidas as amostras sabidamente positivas (pelo histopatológico) e sabidamente negativas, para validação da prova

4.3.8 Validação da PCR qualitativa e qPCR

Para validação tanto da PCR qualitativa como qPCR, foram submetidas, nas condições de reação padronizadas, em três reações feitas em três dias diferentes, as cinco amostras *in natura* sabidamente positivas para a FCM pelo histopatológico e cinco amostras *in natura* sabidamente negativas.

Na qPCR, a curva padrão foi gerada através do ponto de corte dos valores do *Threshold Cycler* (Ct) em fase linear logarítmica de amplificação frente diluições do vírus, que foram utilizadas para validação dos testes. Os limites de detecção da PCR quantitativa foram determinados como a última diluição na qual todas as reações em triplicata apresentarem resultados positivos.

A sensibilidade analítica foi determinada através da determinação do *threshold*, análise da curva de dissociação (no caso do SYBERGreen®) e dos Ct (*threshold cycle*) produzidos por cada diluição do vírus padrão e da curva padrão fornecidas pelo *software* LightCycler®480 Real-Time PCR System (Roche Molecular Systems, Foster City, CA). A curva padrão foi utilizada para calcular o coeficiente angular da reta (*slope*), composta pelos pontos da curva, para calcular a eficiência da amplificação (*E*). A curva está associada a uma inclinação de, aproximadamente, -3,32 para cada diluição 1:10 do alvo. O *slope* -3,3 relaciona-se a uma eficiência de 100% indicando que o número de moléculas de DNA amplificadas dobra a cada ciclo da qPCR (KUBISTA et al., 2006).

O valor de inclinação da reta obtido pela regressão linear de cada curva padrão gerada foi utilizado para se calcular a eficiência (*E*) de amplificação da qPCR, de acordo com a equação:

$$E=10^{(-1/\text{inclinação})}-1$$

Na qPCR, a variação intra-ensaio foi avaliada com as curvas padrão testadas em triplicata e na PCR qualitativa foi avaliada a variação da intensidade de banda das diluições do vírus em triplicata. O limite de detecção foi determinado como a menor quantidade de DNA padrão que pode ser detectado com 100% de probabilidade. A variação inter-ensaio na qPCR foi determinada por três corridas independentes da curva padrão, em triplicata e na PCR qualitativa por três corridas independentes, em triplicata, das diluições do vírus padrão. (GEBER et al., 2014).

4.3.9 Controles positivos e negativos

Para controle positivo das reações, foi utilizada uma amostra sabidamente positiva pelo histopatológico e PCR qualitativa, sequenciada e analisada no BLAST, tendo homologia de 100% com OvHV-2, quantificada pelo QuantiFluor® dsDNA System, de acordo com o manual do fabricante, feito diluições seriadas e selecionada a menor diluição que a PCR qualitativa e qPCR conseguiu detectar.

Preconizou-se usar como controle positivo, a última diluição viral que obteve resultado positivo no teste de padronização, para que o limiar da prova ficasse o mais baixo possível. O intuito é certificar-se que a reação está mesmo detectando a menor diluição possível do vírus. Para controle negativo foi utilizada uma amostra sabidamente negativa para OvHV-2 pelo histopatológico e PCR qualitativa.

4.3.10 Caracterização do vírus por sequenciamento

Para o sequenciamento, foram selecionadas 13 amostras positivas tanto na PCR qualitativa como qPCR (tabela 3)

Tabela 3 Amostras positivas para OvHV-2 e sequenciadas. *NI=não informado

Identificação da amostra	Ano	Município/ Estado
798/07	2007	Assis/SP
355/09	2009	NI*/PE
G86/09	2009	NI*/PE
G251/09	2009	Lagoa D'Ouro/ PE
1398/09	2009	Martinópolis/SP
364/12	2012	Socorro/SP
24221/12	2012	Ribeirão Preto/SP
20428/13	2013	Bujari/ AC
6414/13	2013	Restinga/SP
7983/13	2013	Itirapuã/SP
8012/13	2013	Morungaba/SP
8013/13	2013	Itaguaçu/ ES
25605/13	2013	Silva Jardim/RJ

Estas amostras (*in natura*) foram amplificadas pela PCR qualitativa (utilizando os *primers* 556 e 755 do quadro 3 referente a região ORF75), submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5%, visualizadas no transluminador e o tamanho do fragmento observado correspondeu aos 422 pb esperado. Em seguida, as bandas presentes no gel foram cortadas com auxílio de um bisturi e submetido ao processo de purificação, para a remoção de reagentes usado na amplificação (DNTps, primers, enzima) que podem interferir no sequenciamento. Para isso foi utilizado o kit Wizard®SV gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), de acordo com instruções do fabricante.

A qualidade de purificação foi verificada em outra corrida eletroforética, com 2µL de DNA purificado por canaleta e comparou-se, visualmente, as intensidades das bandas obtidas.

Após a purificação das amostras, procedeu-se a reação de PCR com cada *primer* (*forward* e *reverse*) 556 e 755 (quadro 4) em tubos separados, utilizando o kit Big Dye Terminator V 3.1 (Applied Biosystem, Austin, Texas, USA) utilizando o pGEM como controle da reação.

Para um volume total de 10 μ L de reação de sequenciamento utilizou-se 2 μ L de Big Dye v. 3.1; 2 μ L de Sequencing Buffer 5X; 1,5 do *primer* (2,5pmol/ μ L) e 4,5 μ L do DNA purificado.

As condições de ciclagem e temperatura encontra-se no quadro 9.

Quadro 9 Condição de ciclagem e temperatura para reação de sequenciamento.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	95	1 min
35	95	30 seg
	50	15 seg
	60	4 min
Hold	4	<i>forever</i>

Após a PCR, precipitou-se o produto em placa MicroAmp[®] Opitcal 96 well Reaction Plate (Applied Biosystem, Austin, Texas, USA) utilizando Isopropanol 75%, conforme protocolo a seguir:

- 1- Transferiu-se o volume da reação de sequenciamento para a placa MicroAmp[®] Opitcal 96 well Reaction Plate (Applied Biosystem, Austin, Texas, USA);
- 2- Adicionou-se 40 μ L de isopropanol 75% em cada amostra;
- 3- Selou-se a placa com filme adesivo e centrifugou-se a 3.000 X g por 40 min;
- 4- Descartou-se o conteúdo da placa por inversão;
- 5- Envolveu-se a placa em papel absorvente e centrifugou-se a 3.000 x g por 90 seg;
- 6- Adicionou-se 100 μ L de isopropanol 75% em cada amostra e descartou-se o conteúdo por inversão;
- 7- Repetiu-se o passo 5.
- 8- Colocou-se a placa em estufa 37°C por 10 min. para secagem;
- 9- Adicionou-se 10 μ L de formamida HI-DI em cada amostra (Applied Biosystem, Austin, Texas, USA)
- 10- Selou-se a placa com filme adesivo e promoveu-se a desnaturação dos produtos no termociclador a 95°C por 2 min;

11- Resfriou-se a placa no *cooler*;

12- Procedeu-se o sequenciamento no Sequenciador Applied Biosystems ABI 3500XL Genetic Analyser (Applied Biosystem, Austin, Texas, USA).

A qualidade das sequências foi avaliada utilizando o *software Sequence Analyzer* (Applied Biosystem, Austin, Texas, USA). Para a análise das sequências utilizou-se os programas BioEdit versão 7.1.11 (HALL, 1999), Blast e ClustalW. As sequências utilizadas como referência foram obtidas no GenBank (quadro 10), sendo que o AIHV-1 foi utilizado como grupo externo. Para a análise filogenética utilizou-se o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 6.0 (KUMAR et al., 2000). A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros, com valor de *bootstrap* de 1000 réplicas.

Quadro 10 Sequências referências obtidas no GenBank para análise filogenética do OvHV-2.

Identificação	N° do acesso	Ano
Genoma Completo/EUA	DQ198083.1	2007
BJ1035/Ucrania	AY839756.1	1993
Bisão/ Índia	JQ801454.1	2012
Cabra/Alemanha	HM216475.1	2007
Bovino/ Índia	JX442930.1	2012
Bezerros/ Paraná	KC123170.1	2012
Cabra/Alemanha	HM216477.1	2006
Bovino/Rio Grande do Norte	JQ780445.1	2008
Sambar/ Alemanha	HM216476.1	2006
Alce/Alemanha	HM216491.1	2007
Bisão/ Alemanha	HM216483.1	2008
Bovino/África do Sul	EU851177.1	2005
Bovino/África do Sul	EU851175.1	2004
Alcelaphine herpesvirus 1	X80691.1	1995

4.3.11 Controle interno da PCR

Foi utilizado um controle interno para o gene da *beta*-actina (região altamente conservada do genoma) para diminuir os possíveis falsos negativos decorrentes da não extração do DNA viral e por possíveis fatores de inibição da PCR presentes nas amostras congeladas e incluídas em parafina. Todas as amostras negativas para a presença do OvHV-2 foram testadas para o gene da β - actina.

Os *primers* utilizados encontram-se no quadro a seguir:

Quadro 11 Sequência, localização da região de hibridação e tamanho do amplificado dos *primers* utilizados na PCR do controle interno do gene da β - actina.

Nome	Autor	Sequência	Amplificado
AC1	HUI et al.; 2004	5'-TGAGACCTTCAACACGCC- 3'	Aprox.745 pb
AC2		5'-ATCTGCTGGAAGGTGGAC-3'	

As condições de ciclagem e temperatura para PCR qualitativa foram as seguintes: 95° por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 30 segundo, 56°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; 72°C por 5 minutos e 10°C *forever*.

4.4 Isolamento viral em cultura celular

Para realizar o isolamento do OvHV-2 em cultura celular, aproximadamente 2g de cada tecido conservado a -20°C (SNC, fígado, olho, rim e linfonodo) de um animal, sabidamente positivo na PCR qualitativa e qPCR para OvHV-2, foi macerado, separadamente, com areia e ressuspensos em 8mL de meio essencial mínimo de Eagle (MEM) com 1% de antibiótico (ATB) e mantidos a 4°C por 1h para ação do mesmo. Após esse período, as amostras foram congeladas a -20°C, descongeladas e centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido para posteriormente ser inoculado.

Foram utilizadas células MDBK (*Madin and Darby Bovine Kidney*), adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA). As células foram cultivadas em placas de poliestireno de 24 cavidades, próprias para cultivo celular (TPP, Techno Plastic Products AG®, Switzerland), com meio essencial mínimo (MEM- Nutricel®, Campinas, Brasil) acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio (Merck®, Darmstadt, Alemanha), tamponado

com 25mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanossulfônico (HEPES- Biosolve[®], Westford, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) esterilizado e inativado (Nutricell[®], Campinas, Brasil).

Em monocamada pré-formada de células MDBK (células preparadas com 24h de antecedência, apresentando de 85-100% de confluência da monocamada), o meio de manutenção foi removido e as amostras foram inoculadas (200µL da suspensão de cada tecido) e incubadas por 1h à 37°C com 5% de CO₂ (Thermo Electron Corporation[®], Merlette, EUA) para adsorção do vírus na célula. Posteriormente foi realizada a lavagem do inóculo com meio MEM e adicionado 1mL de meio de manutenção (meio MEM com 10%SFB, 1% de ATB, 1% de L-glutamina e 1% de anfotericina B). Incubou-se a placa à 37°C com 5% de CO₂ e realizado leituras diárias para avaliação do efeito citopático. Como o OvHV-2 é um vírus de difícil isolamento, as placas inoculadas foram incubadas até as células apresentarem sinais de morte. Quando não houve aparecimento de efeito citopático, as amostras foram reinoculas em cultivo celular em passagens sucessivas.

5. RESULTADOS

5.2 Padronização da Extração

Os três protocolos de extração de DNA para material *in natura* (DNAzol[®] (Invitrogen), Trizol[®] (Invitrogen) e Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega)) foram avaliados pela PCR qualitativa, utilizando amostra de campo sabidamente positiva para o OvHV-2 e, portanto, desconhecia-se o título viral, por isso não foi possível identificar o limiar de detecção dos ensaios. Porém a eficiência de cada protocolo foi avaliada pela qualidade e intensidade da banda específica no gel de agarose 1,5% (figura 5).

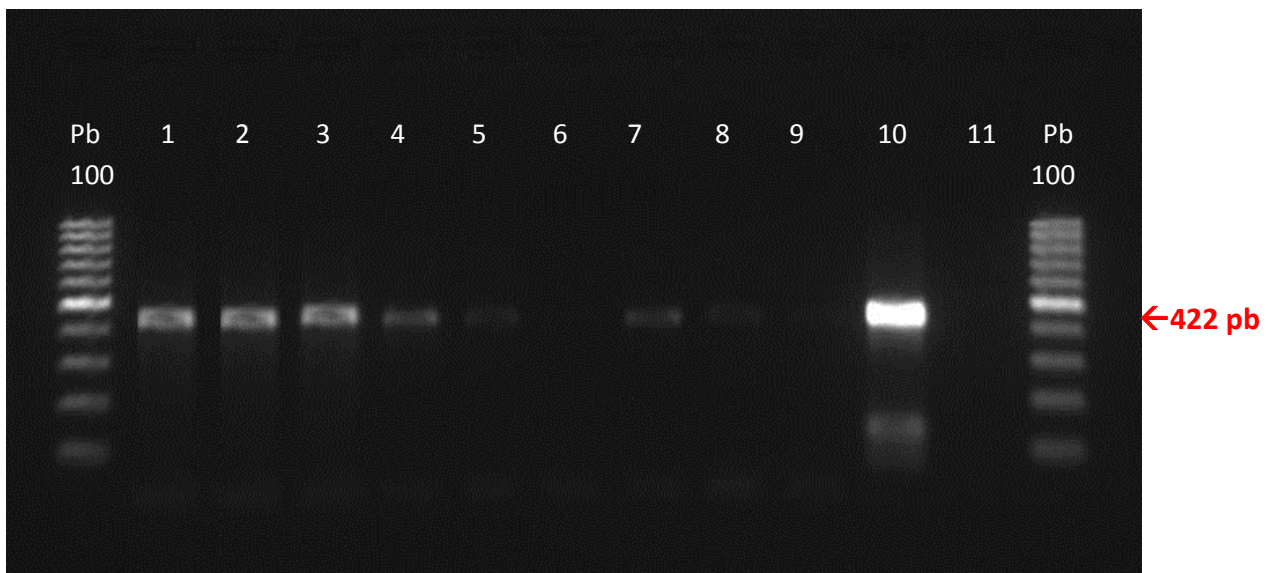


Figura 5 Gel de agarose mostrando a eficiência dos protocolos de extração do material *in natura*.

Conforme indicado na figura 5 em 1, 2 e 3 estão as bandas obtidas pela extração com Trizol. Em 4, 5 e 6 estão as bandas da extração com DNAzol[®]. Em 7, 8 e 9 estão as bandas obtidas pela extração com o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification. Em 10 está o controle positivo e em 11 o negativo. Todas as bandas correspondem ao fragmento de 422 pb específico e esperado. Destaca-se que resultados semelhantes foram obtidos nas três reações feitas em três dias diferentes

Na figura 6 está a foto do gel com a amplificação dos extraídos dos kits comerciais para material parafinado sendo NucleoSpin[®] FFPE DNA (Macharey- Nagel) em 1, 2 e 3, Invisorb[®] Spin Tissue Mini Kit (STRATEC Molecular) em 4, 5 e 6, innuPREP[®] DNA Mini Kit (Analytik Jena) em 7 e 8. Não obteve-se sucesso na extração do DNA, sendo que NucleoSpin[®] FFPE

DNA (Macharey- Nagel), Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (STRATEC Molecular), não foi possível extrair o DNA e o DNA Mini Kit (Analytik Jena) observa-se arrasto na eletroforese indicando a má qualidade do DNA que está, possivelmente, fragmentado (em 7 e 8).



Figura 6 Gel de agarose mostrando a eficiência da extração dos kits para o material parafinado (NucleoSpin® FFPE DNA (Macharey- Nagel), Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (STRATEC Molecular), innuPREP® DNA Mini Kit (Analytik Jena)), seguidos pelo controle positivo com a altura específica e esperada (422 pb).

Na figura 7 está a foto do gel com a amplificação do extraído pelo QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, sendo que também não obteve-se sucesso na extração, observado assim arrasto na eletroforese.

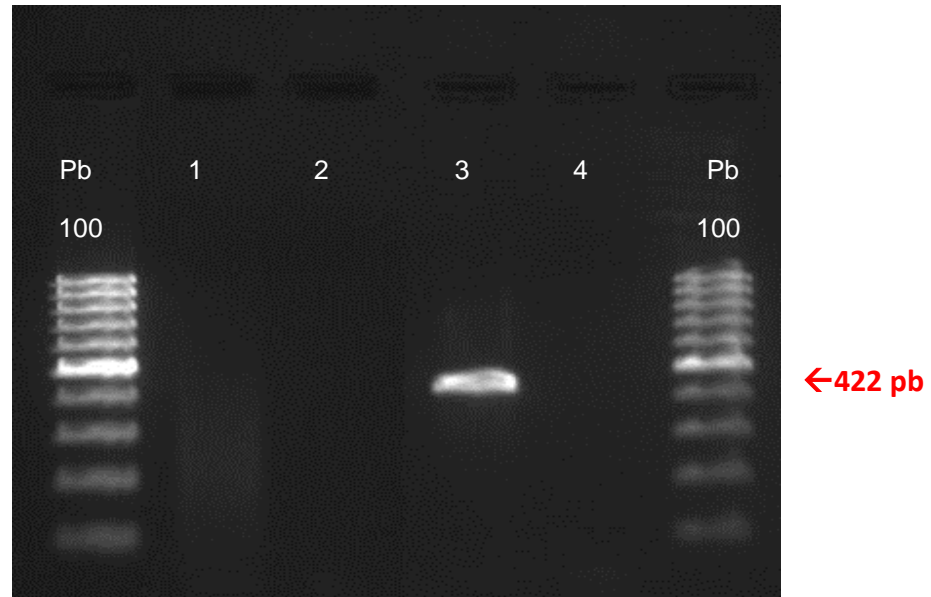


Figura 7 Gel de agarose mostrando a eficiência da extração QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (em 1) seguido pelo controle positivo (em 3) com a altura específica e esperada (422 pb) e branco (em 4)

O Hight Pure FFPE DNA Isolation kit (Roche Molecular Systems, Foster City, CA) também não se obteve sucesso na extração, sendo que, para a amplificação das amostras extraídas por esse kit, foi realizado o qPCR (sistema TaqMan[®]) e todos apresentaram resultado negativo.

Dos dois protocolos baseados na literatura, o sugerido por Chan et al. (2001) foi o mais eficiente pelo sucesso na extração do DNA de várias partes do sistema nervoso central de um bovino com lesões histológicas características para FCM (figura 8).

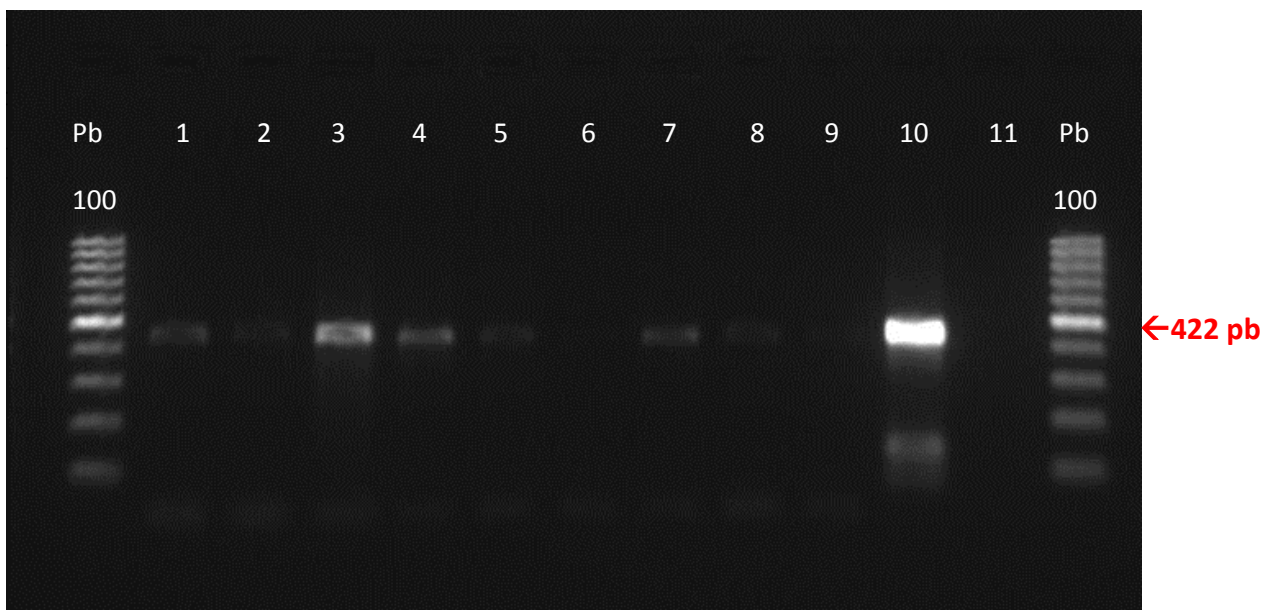


Figura 8 Gel de agarose da eficiência de extração do protocolo recomendado por Chan et al. (2001) de diversas partes do sistema nervoso central de uma amostra sabidamente positiva (poços 1 a 9) seguida do controle positivo (poço 10) e negativo (poço 11) com altura esperada de 422 pb.

Quando seguiu-se o protocolo recomendado por Nascimento et al. (2003), foi possível a extração do DNA (figura 9), no entanto, observa-se arrasto quando realizada a eletroforese e, adicionando-se o vírus padrão na diluição 10^5 cópias de DNA/ μ L ao extraído por esse protocolo, não obteve-se banda nas condições de ciclagem validadas, comprovando assim a presença de inibidores de PCR, mesmo realizando-se *nested-PCR*.

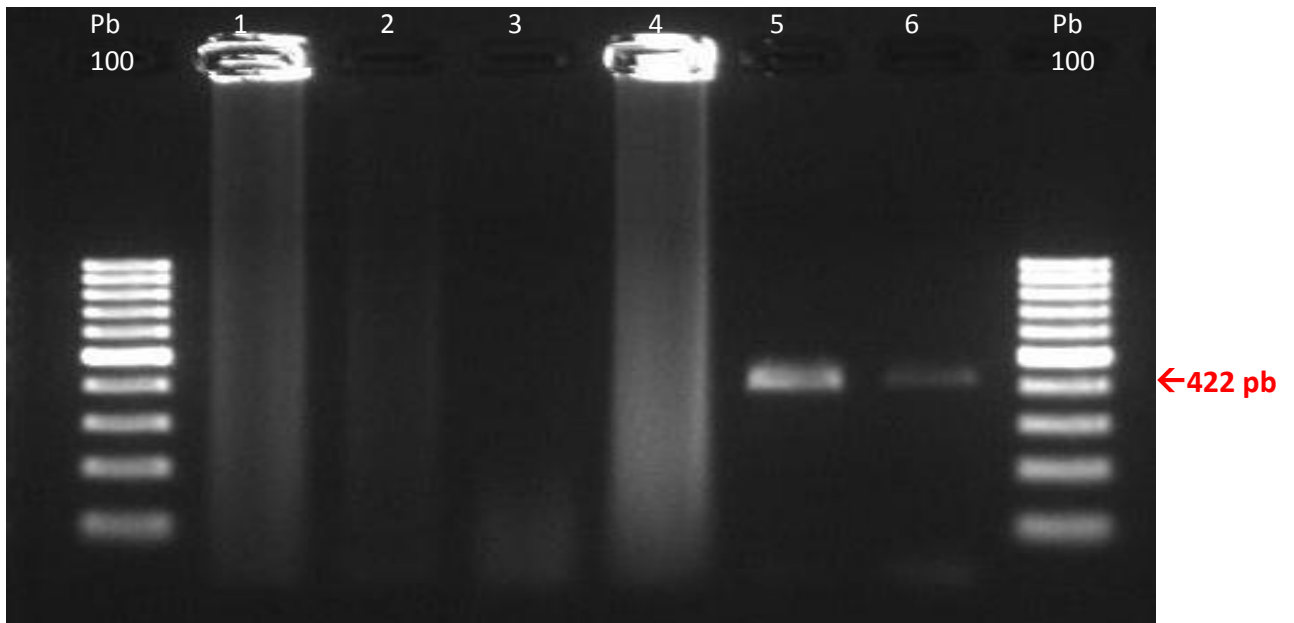


Figura 9 Gel agarose da extração feita segundo Nascimento et al. (2003) observando-se arrasto (poços 1 a 4) seguidas de dois controles positivos (5 e 6) na altura esperada de 422 pb.

5.3 Determinação da amostra controle positivo padrão

Para a padronização da PCR qualitativa e qPCR, analisou-se a sensibilidade analítica destas.

Como há uma grande dificuldade no isolamento do OvHV-2 *in vitro*, utilizou-se uma amostra clínica com lesões características para FCM, da cidade de Assis em São Paulo (SP), como padrão para validação da prova. Esta amostra foi amplificada pela PCR qualitativa (utilizando os *primers* do quadro 3) e submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%. A amostra foi visualizada e o tamanho do fragmento observado correspondeu aos 422 pb esperado. Em seguida, o amplificado foi purificado a partir da banda específica do gel e sequenciado.

A sequência viral obtida foi verificada no BLAST e obteve-se de 97 a 100% de identidade com vários isolados de OvHV-2 de diversas partes de mundo, incluindo o genoma completo do OvHV-2 e o extraído BJ1035, a partir do qual foi desenvolvido o desenho dos *primers* utilizados neste trabalho (figura 10), comprovando a confiabilidade de utilizar este purificado como controle para padronização e validação tanto da PCR qualitativa como PCR quantitativa.

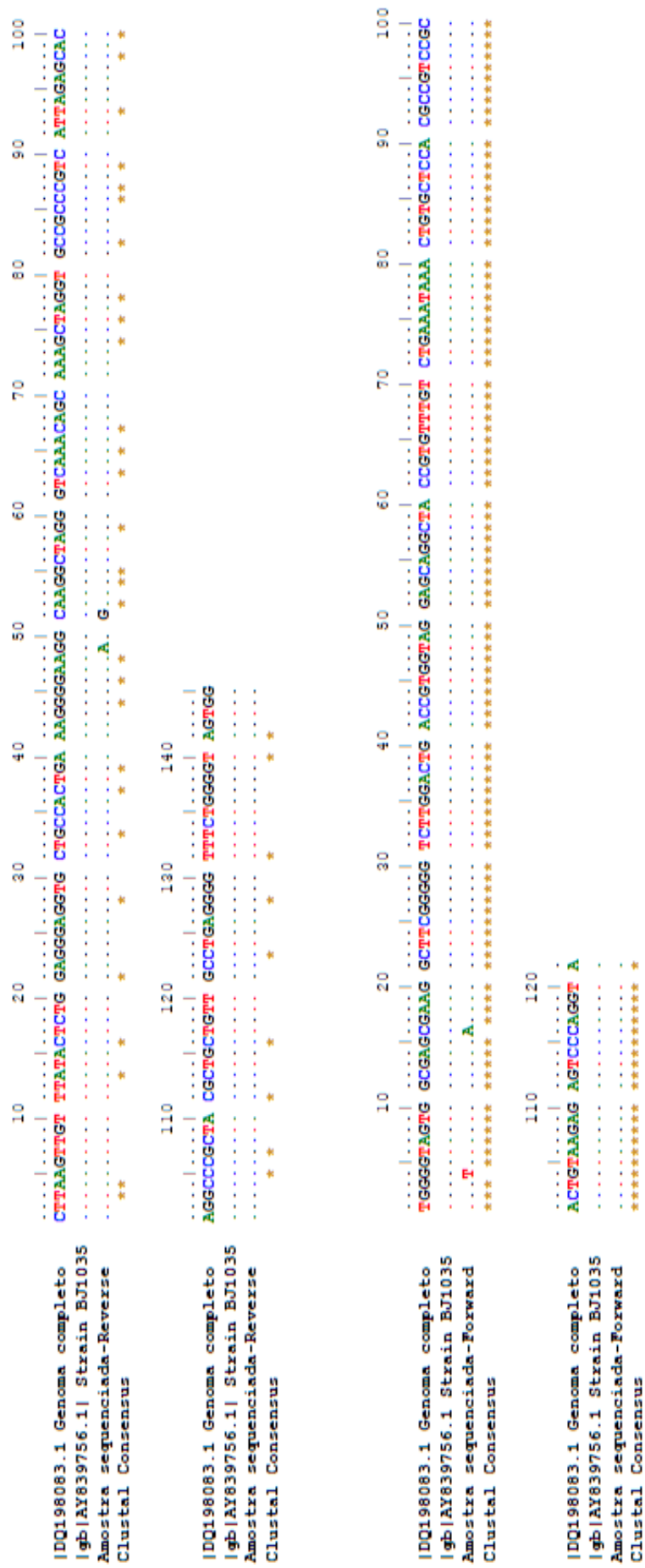


Figura 10 Alinhamento da amostra sequenciada e genoma completo de OvHV-2 (HART et al., 2007) e Strain BJ1035 (BAXTER et al., 1993)

Para determinar a sensibilidade analítica da reação, a concentração do DNA viral deste purificado foi verificada utilizando o QuantiFluor® dsDNA System de acordo com o manual do fabricante e foi obtida uma concentração de 509,6ng/μL em 2μL de amplificado. Este valor foi dividido por 2, para obtenção da concentração em 1μL do purificado, obtendo o valor de 254,8ng/μL. Como este valor está em massa e, para verificar a sensibilidade analítica da PCR é necessário verificar o número de cópias por microlitro, faz-se necessário a conversão deste valor, obtendo-se assim uma concentração de $9,93 \times 10^{11}$ cópias de DNA/μL.

A partir disso foram feitas diluições seriadas deste purificado, tido como padrão neste estudo, da seguinte forma:

- 1) Foi diluído 50X o purificado (10μL do purificado + 490 μL de *Nuclease-free water*) obtendo uma concentração de aproximadamente $0,9 \times 10^7$ cópias de DNA/μL;
- 2) Foram feitas diluições seriadas na base 10 (5μL do purificado + 45μL do diluente) obtendo-se as seguintes diluições: 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , e 10^0 .

Inicialmente, estas diluições foram feitas em *Nuclease-free water* e quantificadas utilizando o QuantiFluor® dsDNA System, de acordo com o manual do fabricante, para verificar o número de cópias de DNA viral presente em cada diluição, e obteve-se os resultados apresentados na tabela 4.

Tabela 4 Quantificação das diluições seriadas em *Nuclease-free water* do OvHV-2

Número de cópias por μL	Diluição Seriada	Número de cópias por μL esperadas	Número de cópias por μL quantificada
10^7	Solução estoque	10.000.000	$0,87 \times 10^7$
10^6	1/10	1.000.000	$1,98 \times 10^6$
10^5	1/100	100.000	$1,54 \times 10^5$
10^4	1/1000	10.000	$0,86 \times 10^4$
10^3	1/10.000	1.000	$0,97 \times 10^3$
10^2	1/100.000	100	$0,85 \times 10^2$
10^1	1/1000.000	10	$1,51 \times 10^1$
10^0	1/10.000.000	1	$1,98 \times 10^0$

Desta forma, estas diluições obtidas foram empregadas como padrão para a avaliação da sensibilidade analítica da PCR qualitativa e qPCR.

Posteriormente essas mesmas diluições foram feitas em extraídos de amostras de SNC bovino sabidamente negativas para o OvHV-2, para verificar possíveis inibidores ou algum outro fator que diminuísse a sensibilidade analítica da PCR ou alterasse a qualidade da reação.

5.4 Padronização e Validação da PCR qualitativa

Para aperfeiçoar a PCR qualitativa, foram feitas otimizações na programação e temperatura de amplificação da mesma. Inicialmente, foi feito gradiente de temperatura tanto na primeira como na segunda amplificação. Levando-se em conta que a temperatura de *Melting* do *primer* 556 é 61,8°C e do *primer* 755 é 56,6°C foi feito gradiente de 60°C a 67°C, analisado em gel de agarose 1,5% e obteve-se o seguinte resultado mostrado na figura 11.

Para a segunda amplificação fez-se um gradiente de 65°C a 70°C, levando-se em conta que a temperatura de *Melting* do *primer* 556 é 61,8°C e 555 é 66,9°C e obteve-se o seguinte resultado representado na figura 11.

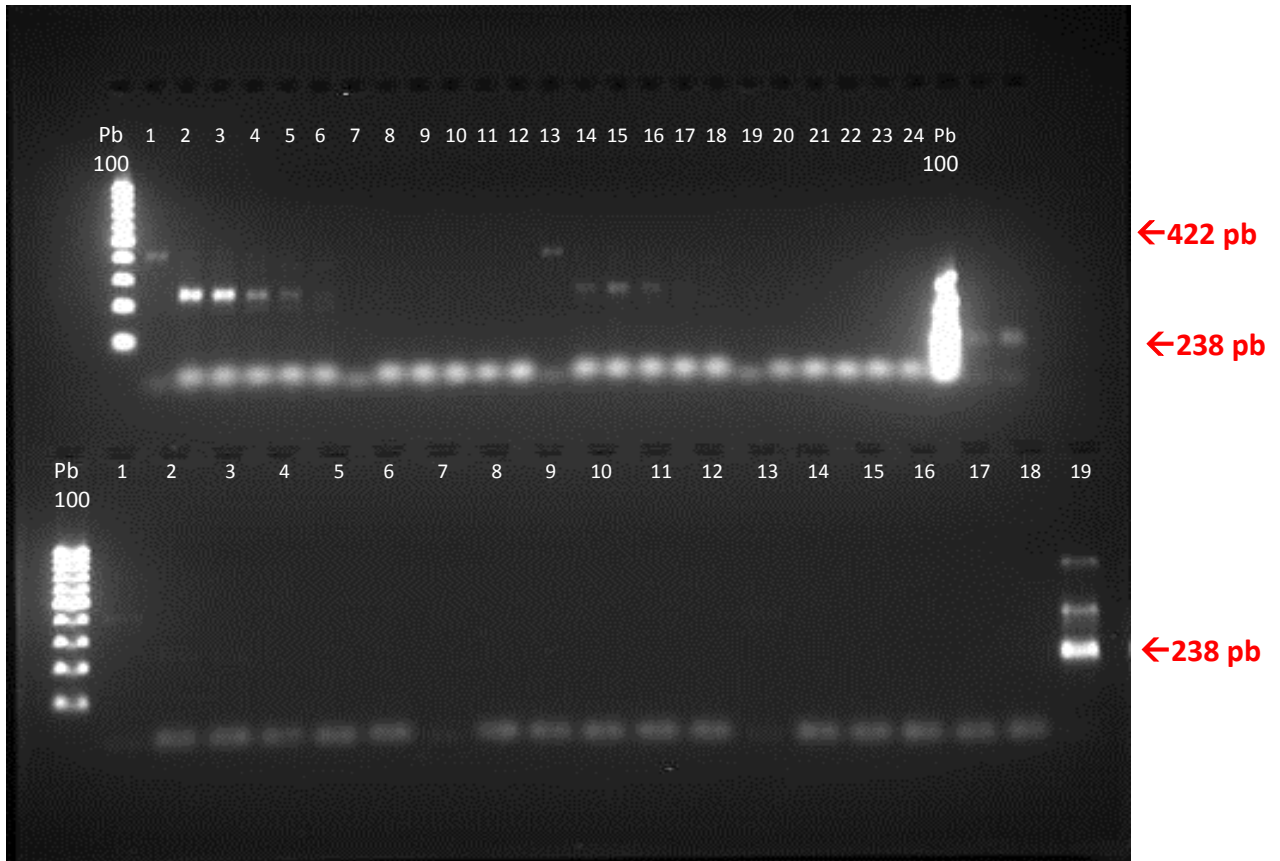


Figura 11 Gel do gradiente de temperatura da PCR qualitativa da primeira e segunda amplificação.

Em 1 do primeiro gel do gradiente de temperatura (figura 11) foi feita a 1ª amplificação a 60°C, em 2 a 7 foi feita a segunda amplificação a 65°, 66°C, 67°C, 68°C 69°C e 70°C respectivamente, utilizando o produto da PCR da 1ª amplificação a 60°C. Em 13 foi feita a 1ª amplificação a 62°C, em 14 a 19 foi feita a segunda amplificação a 65°, 66°C, 67°C, 68°C 69°C e 70°C respectivamente utilizando o produto da PCR da 1ª amplificação a 62°C, e assim por diante com as temperaturas da 1ª amplificação a 63°C; 66°C e 67°C.

Deste modo obteve-se a temperatura padrão de 60°C na primeira amplificação e 67°C na segunda amplificação (em 3 do primeiro gel da figura 11 e figura 12).

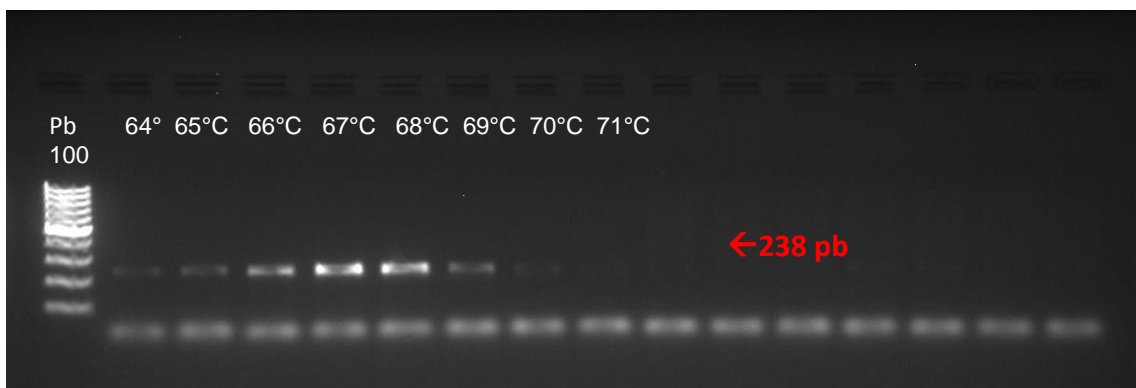


Figura 12 Gel do gradiente de temperatura da 2ª amplificação da PCR qualitativa sendo que a 1ª amplificação foi feita a 60°C.

Assim sendo, obteve-se a ciclagem e temperatura padrão para FCM. Submeteu-se então as diluições em *Nuclease-free water* do vírus padrão em três reações feitas em três dias diferentes e obteve-se o seguinte resultado apresentado na figura 13.

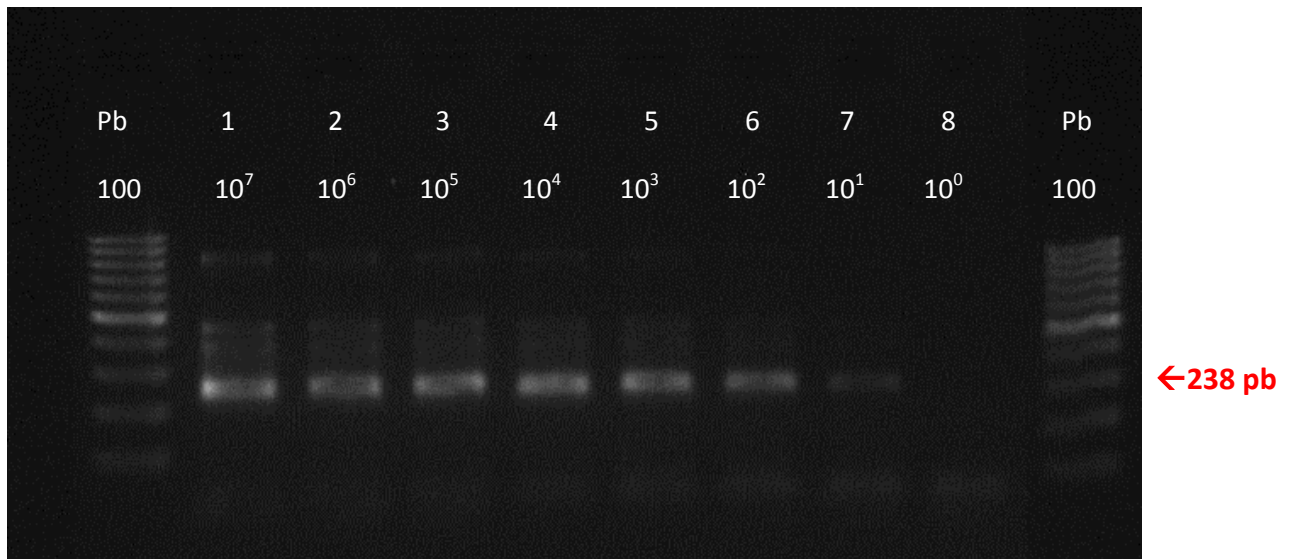


Figura 13 Gel de agarose indicando o limiar de detecção das diluições do vírus padrão em *Nuclease-free water* com a altura esperada de 238 pb específico.

Pela figura 13 observou-se que a o limiar de detecção foi de 10^1 cópias de DNA/ μ L, diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias diferentes, apresentaram resultados positivos.

Submeteu-se então as diluições do vírus padrão em extraído do SNC sabidamente negativos para o OvHV-2, em três reações feitas em três dias diferentes e observou-se que a o limiar de detecção foi de 10^1 cópias de DNA/ μ L na primeira amplificação e 10^2 cópias de DNA/ μ L na segunda amplificação, diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias diferentes, apresentaram resultados positivos (figura 14).

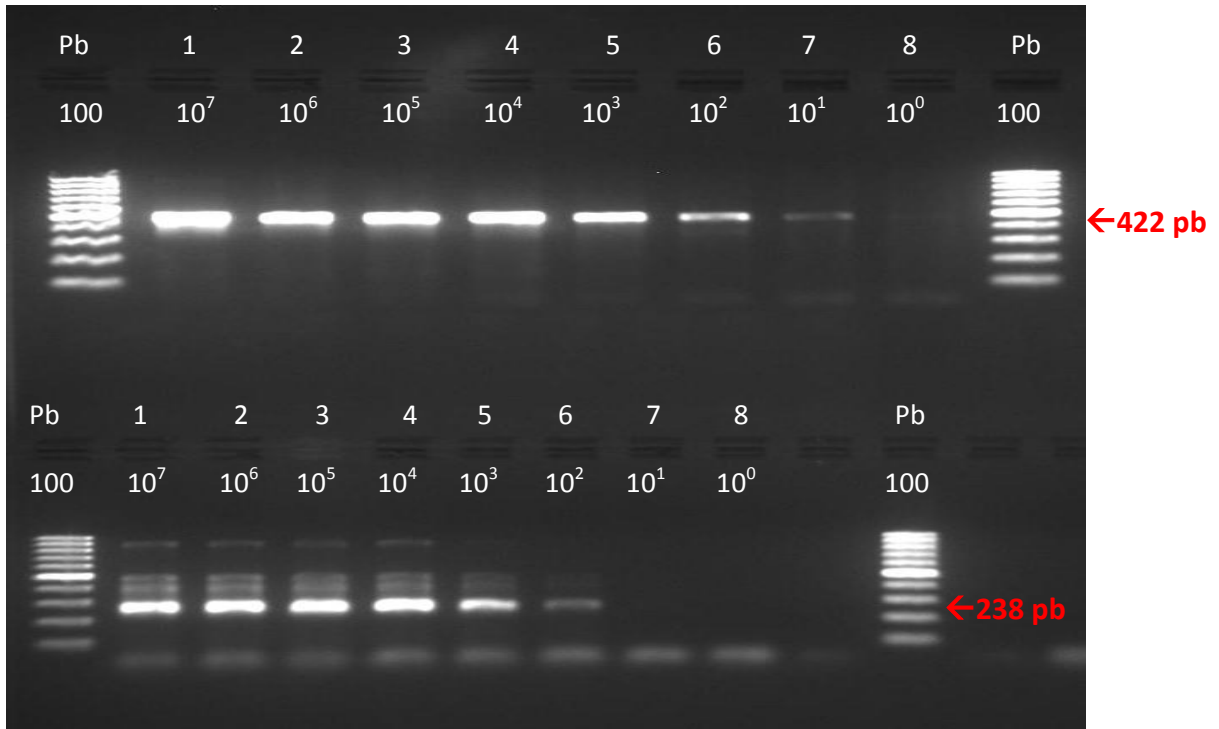


Figura 14 Gel de agarose indicando o limiar de detecção das diluições do vírus padrão em extraído de SNC bovino sabidamente negativo com a altura esperada de 422 e 238 pb específico.

Para realizar a PCR qualitativa utilizando somente os *primers* 556 e 555 (da segunda amplificação) foi feito um gradiente de 65°C a 70°C utilizando as diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do 10⁴ a 10¹ e obteve-se o seguinte resultado observado na figura 15.

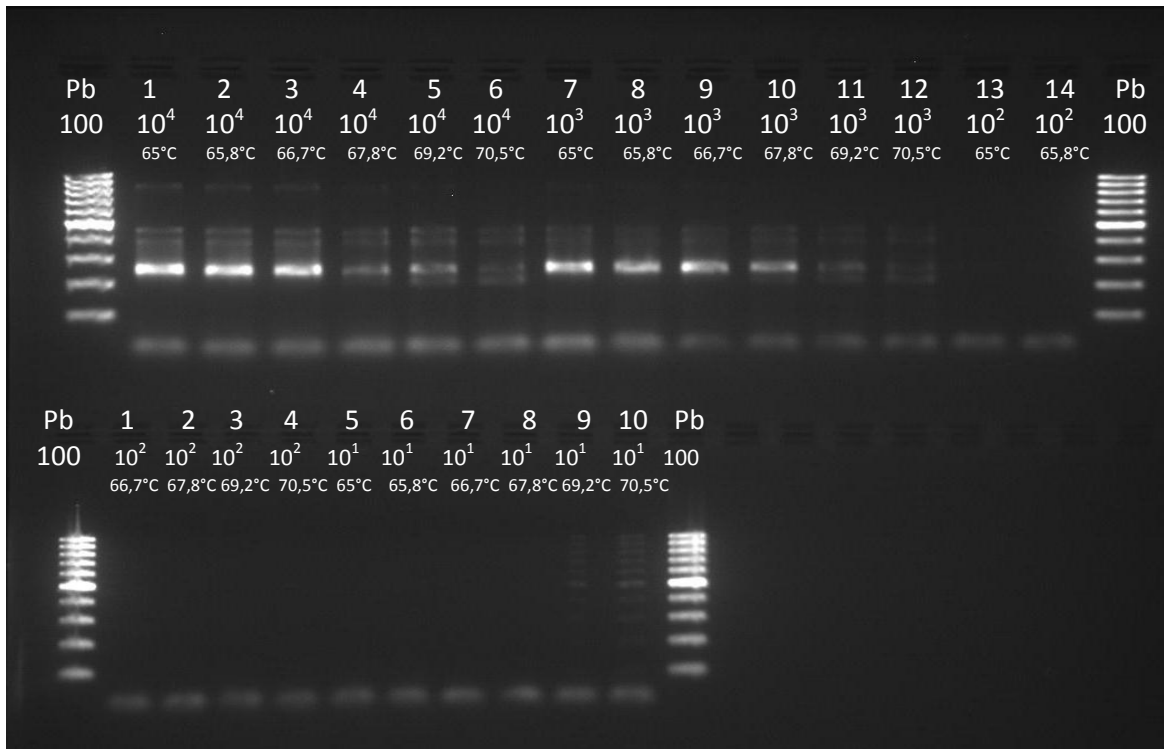


Figura 15 Gel do gradiente de 65°C a 70°C utilizando as diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do 10^4 a 10^1 .

Assim obteve-se a temperatura ideal de 66°C. Submeteu-se então as diluições em extraído do SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do vírus padrão em três reações feitas em três dias diferentes e observou-se que a o limiar de detecção foi de 10^3 cópias de DNA/ μ L, diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias diferentes, apresentaram resultados positivos (figura 16).

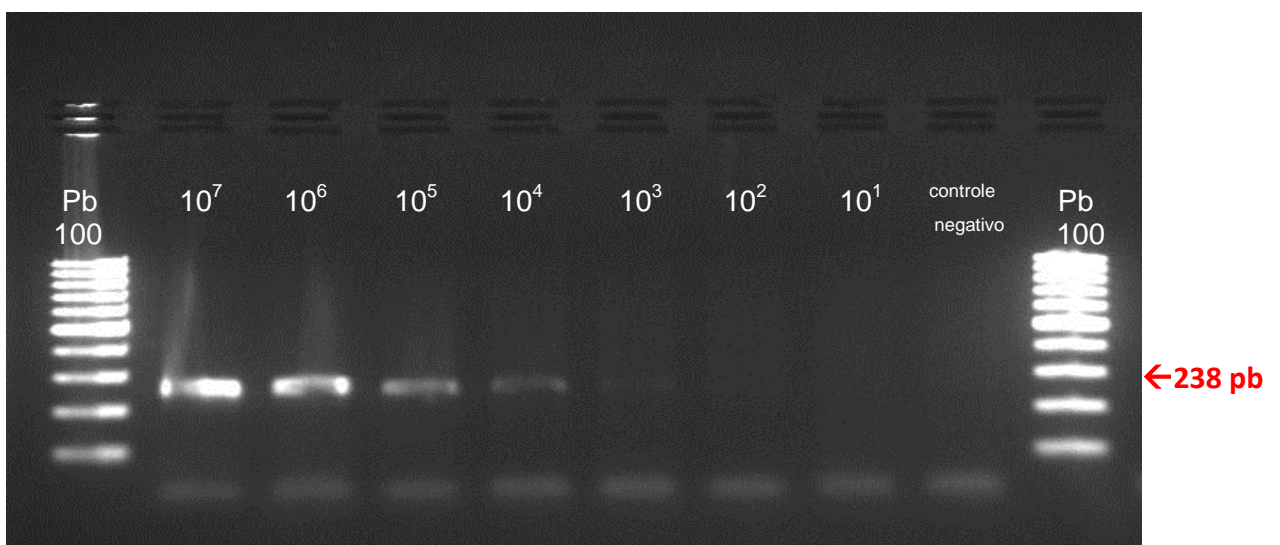


Figura 16 Gel de agarose indicando o limiar de detecção das diluições do vírus padrão em extraído de SNC bovino sabidamente negativo com a altura esperada de 238 pb específico utilizando os *primers* 556 e 555.

Os resultados das cinco amostras *in natura* sabidamente positivas para a FCM pelo histopatológico e cinco amostras *in natura* sabidamente negativas, submetidas em três reações feitas em três dias diferentes nas condições de reação padronizada, corresponderam ao esperado, indicando a validação e confiabilidade do uso da técnica na rotina laboratorial para diagnóstico da FCM associada a ovinos.

5.5 Padronização e validação da qPCR–Sistema SYBR® Green

Para a padronização da qPCR pelo sistema SYBR® Green, foi verificada a sensibilidade analítica da prova. Para aperfeiçoá-la, foram testadas diversas concentrações dos *primers*, conforme tabela 2, e obteve-se a melhor concentração de 500nM, tanto para o *primer forward* como para o *primer reverse*, conforme figura 17.

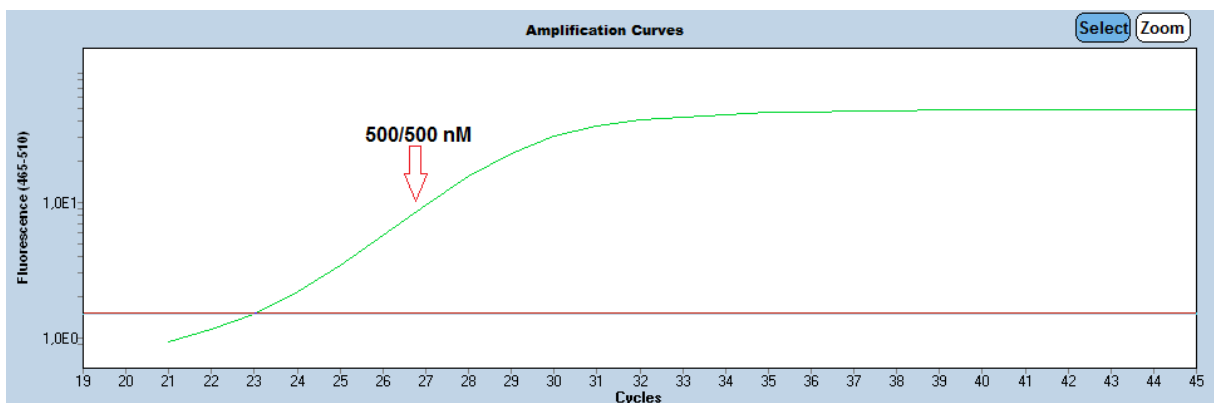


Figura 17 Curva da melhor concentração dos *primers forward* e *reverse*- Sistema SYBR® Green.

Determinado a melhor concentração dos *primers*, submeteram-se então as diluições em *Nuclease-free water* do vírus padrão, da concentração 10^5 a 10^0 cópias de DNA/ μ L, sendo que o limiar de detecção da qPCR sistema SYBR® Green foi de 10^0 cópias de DNA/ μ L, diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias diferentes, apresentaram resultados positivos. A curva de *Melting* apresentou um pico único de fluorescência, demonstrando assim a especificidade da reação, sendo que a *Tm* foi de aproximadamente 86°C (figura 18,19 e tabela 5)

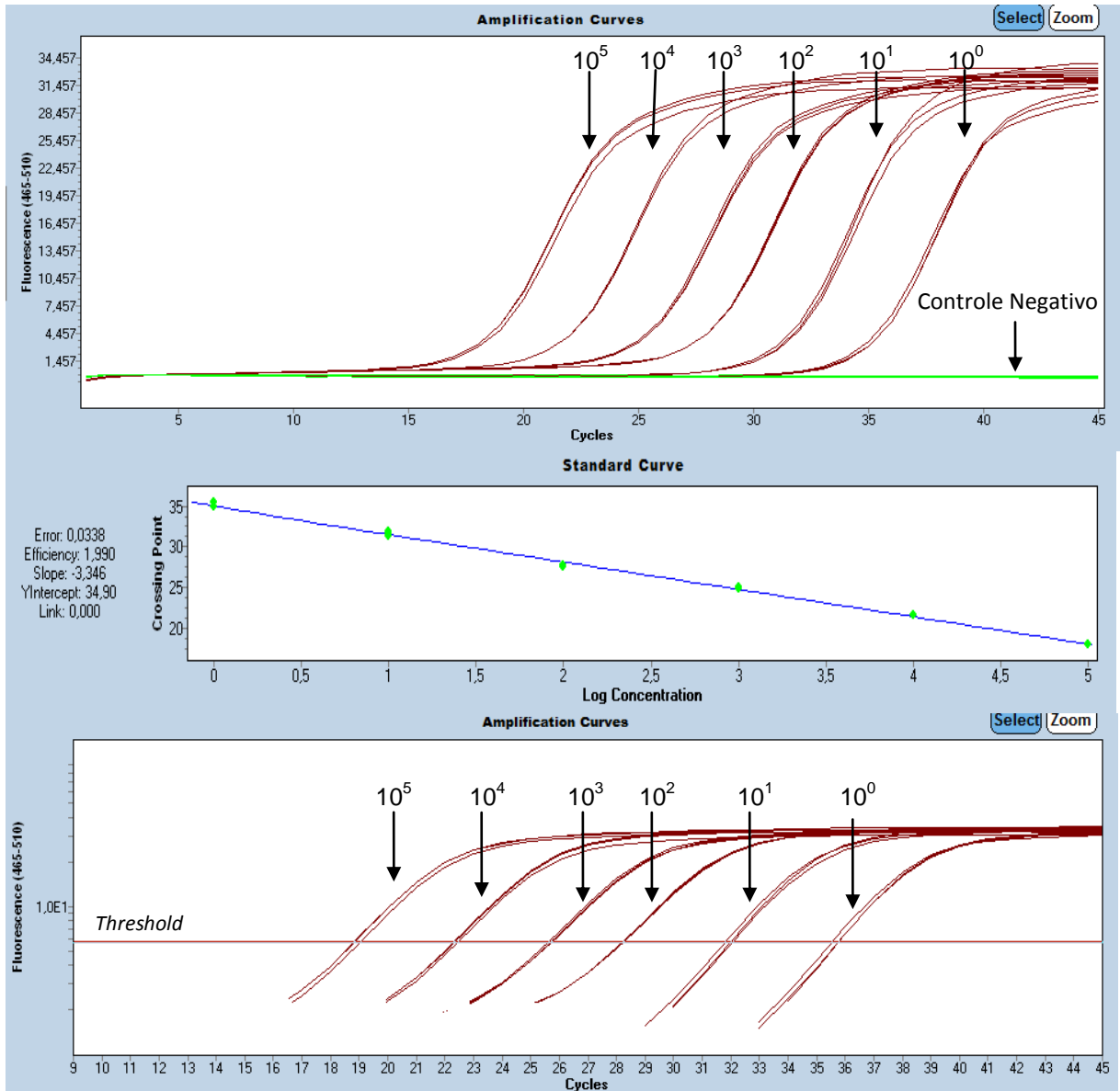


Figura 18 Curva padrão realizada com o sistema SYBR[®] Green, diluições em *Nuclease Free Water* 10^5 a 10^0 .
Valores da reação: Erro = 0,0338 ; Eficiência = 1,990 ; Slope = -3,346

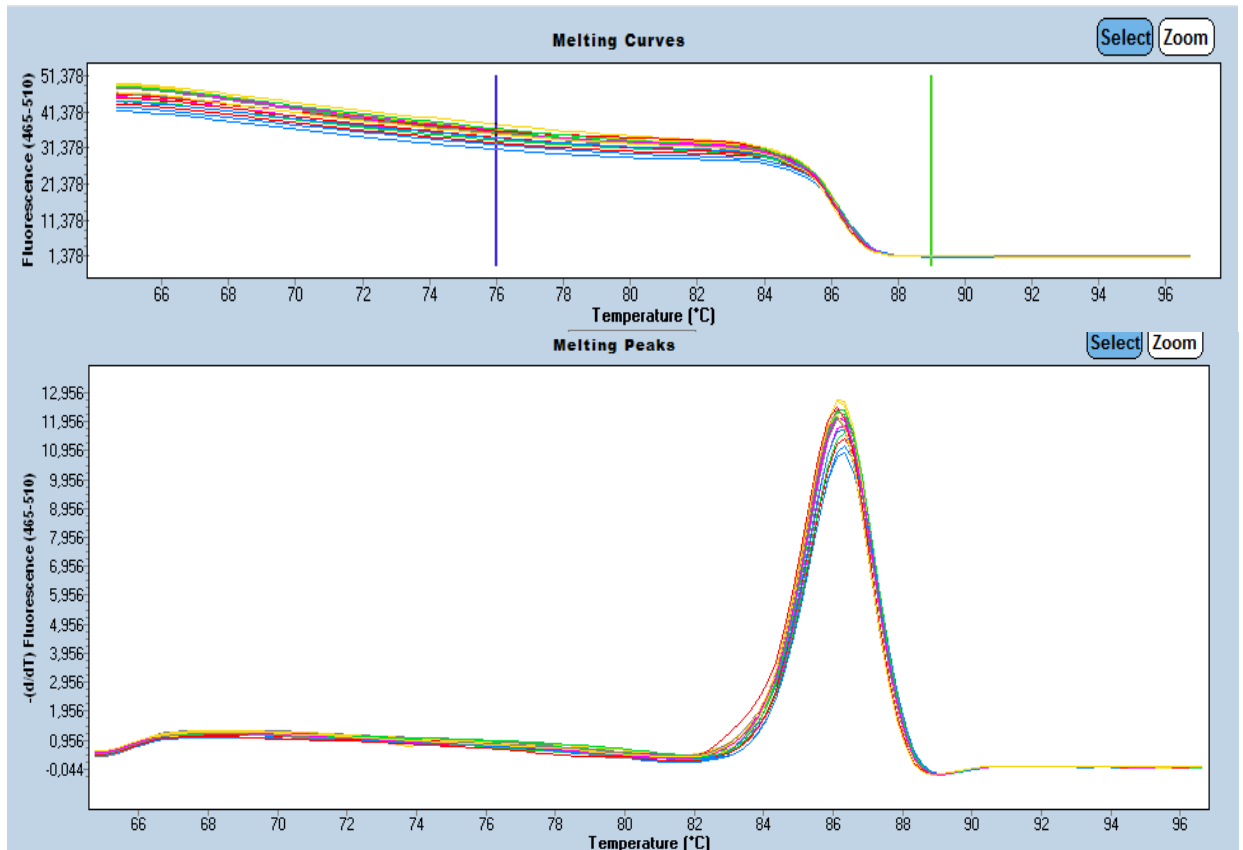


Figura 19 Curva de *Melting* realizada com o sistema SYBR[®] Green, diluições em *Nuclease Free Water* 10^5 a 10^0 com pico de T_m de 86 °C.

Tabela 5 -Diluições em *Nuclease Free Water* do DNA padrão, média da C_p e das concentrações de DNA por μL Sistema SYBR[®] Green.

Diluição DNA padrão	Média do C_p	Cópias de DNA por μL
10^5	18,12	$1,09 \times 10^5$
10^4	21,64	$0,85 \times 10^4$
10^3	24,98	$0,97 \times 10^3$
10^2	27,10	$0,92 \times 10^2$
10^1	30,87	$1,12 \times 10^1$
10^0	34,77	$0,98 \times 10^0$

Posteriormente, submetem-se então as diluições do vírus padrão em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 (10^5 a 10^0 cópias de DNA por μL), conforme item 4.2.4 deste trabalho, para realizar o limiar de detecção da prova e avaliar possíveis fatores de inibição presente no extraído. Sendo assim, o limiar de detecção foi de 10^0 cópias de DNA/ μL , diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias

diferentes, apresentaram resultados positivos. A curva de *Melting* apresentou um pico único de fluorescência, demonstrando assim a especificidade da reação, sendo que a T_m foi de aproximadamente 86°C (figura 20,21 e tabela 6)

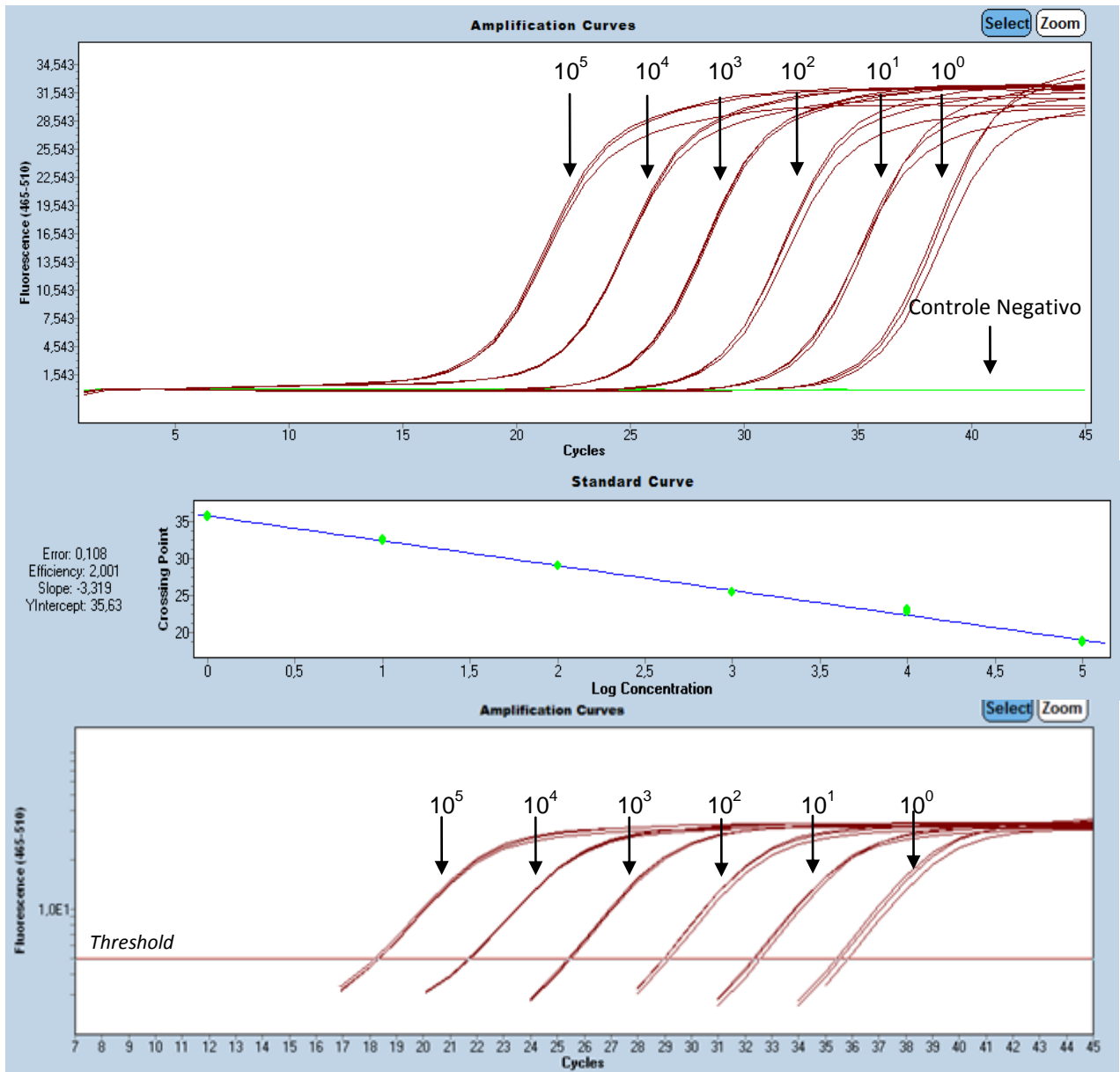


Figura 20 Curva padrão realizada com o sistema SYBR[®] Green, diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 10^5 a 10^0 . Valores da reação: Erro =0,108; Eficiência = 2,001; Slope= -3,319.

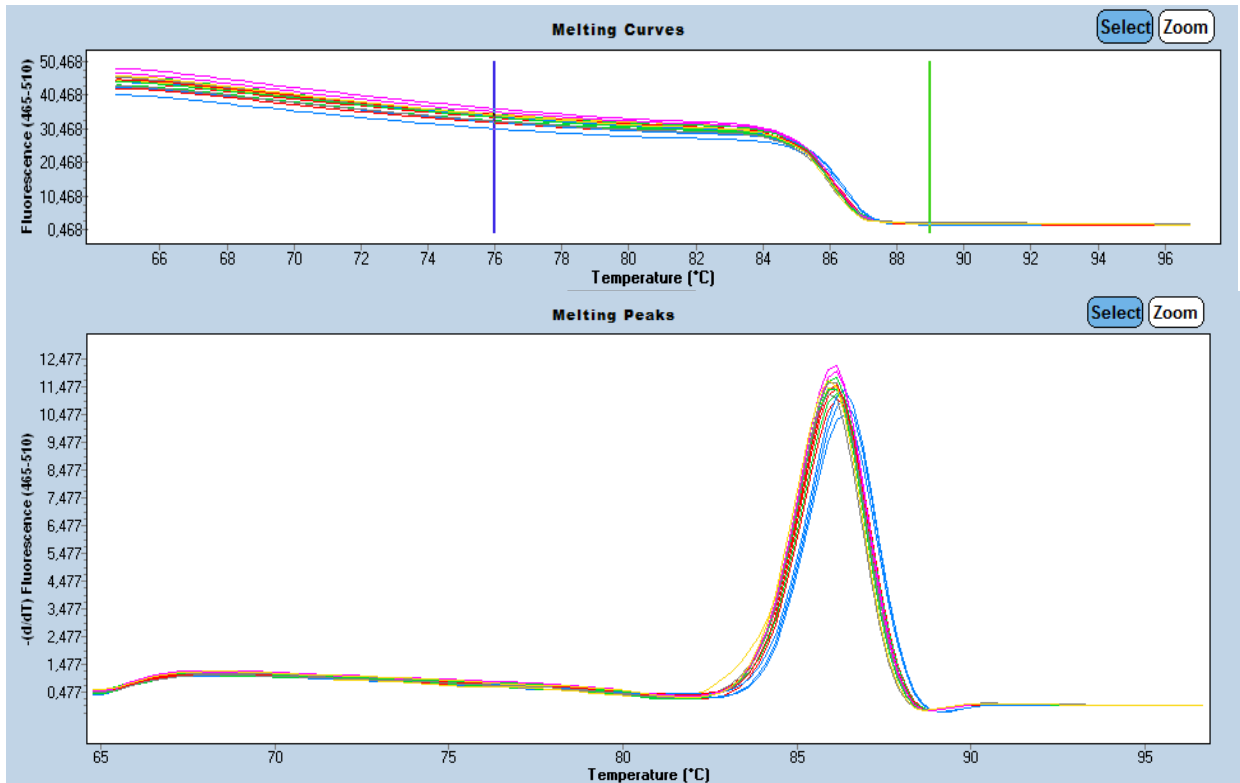


Figura 21 Curva de *Melting* realizada com o sistema SYBR® Green, diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 10^5 a 10^0 com pico de T_m de 86 °C.

Tabela 6 Diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do DNA padrão, média da C_p e das concentrações de DNA por μL - Sistema SYBR® Green.

Diluição DNA padrão	Média do C_p	Cópias de DNA por μL
10^5	18,14	$1,1 \times 10^5$
10^4	21,65	$0,95 \times 10^4$
10^3	24,99	$0,99 \times 10^3$
10^2	28,55	$0,98 \times 10^2$
10^1	31,71	$0,91 \times 10^1$
10^0	35,32	$1,34 \times 10^0$

Os resultados das cinco amostras *in natura* sabidamente positivas para a FCM pelo histopatológico e cinco amostras *in natura* sabidamente negativas, submetidas em três reações feitas em três dias diferentes nas condições de reação padronizada, corresponderam ao esperado, indicando a validação e confiabilidade do uso da técnica na rotina laboratorial para diagnóstico da FCM associada a ovinos.

5.6 Padronização e validação da qPCR–Sistema TaqMan®

Para a padronização da qPCR pelo sistema TaqMan®, foi verificada a sensibilidade analítica da prova. Para aperfeiçoá-la, foram testadas diversas concentrações dos *primers* em conjunto com a *probe*, sendo que inicialmente foram testados as mesmas diluições do *primer* para validar o sistema SYBERGreen® com a *probe* a 80nM e, em segunda etapa, foram testadas as melhores diluições do *primer* (500/500; 500/600; 600/500; 600/600nM) em conjunto com diversas diluições da *probe*, (60-100nM) sendo que a concentração mais eficiente dos *primers* (tanto *forward* quanto *reverse*) foi de 500nM e *probe* de 90nM, conforme figura 22.

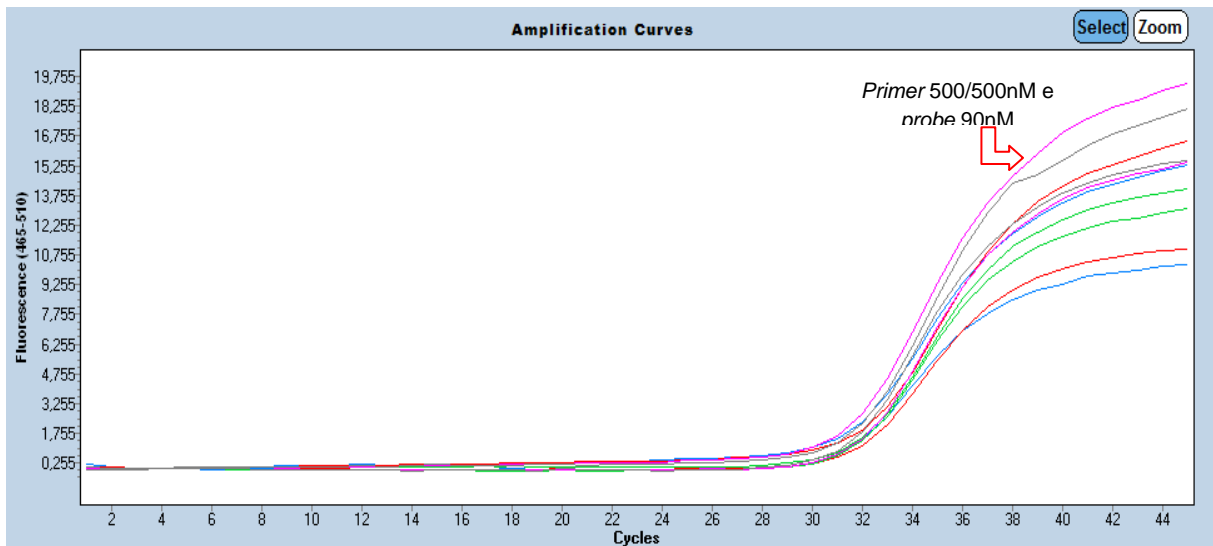


Figura 22 Curva da melhor concentração dos *primers forward* e *reverse* (500/500nM) e *probe* (90nM)- Sistema TaqMan®.

Determinado as melhores concentrações dos *primers* e *probe*, submeteram-se então as diluições em *Nuclease-free water* do vírus padrão (10^5 a 10^0 cópias de DNA por μL) para determinar o limiar de detecção da prova. Este foi de 10^0 cópias de DNA/ μL ., diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias diferentes, apresentaram resultados positivos (figura 23 e tabela 7)

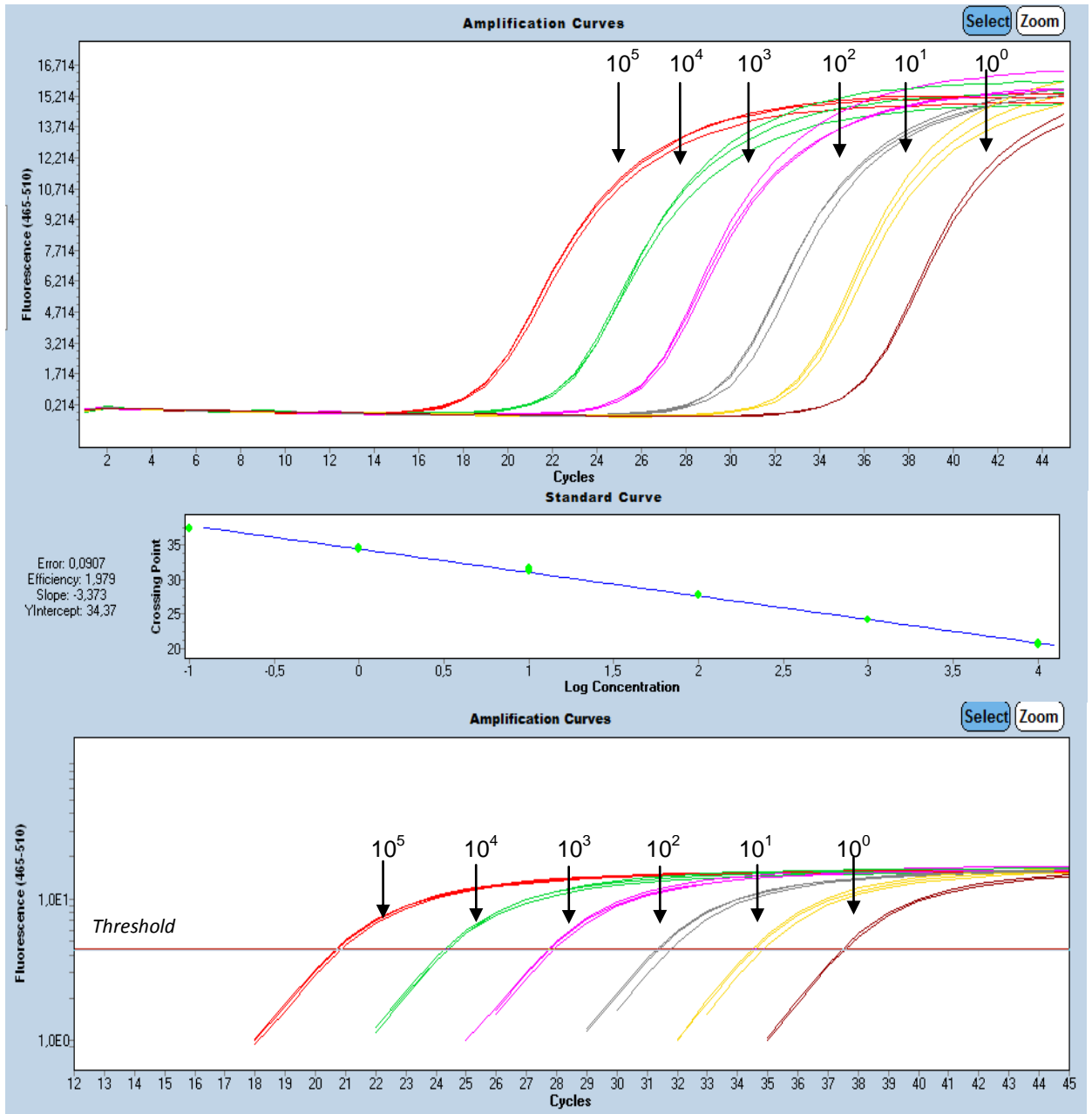


Figura 23 Curva padrão realizada com o sistema TaqMan[®], diluições em *Nuclease Free Water* 10^5 a 10^0 .
Valores da reação: Erro = 0,0907; Eficiência = 1,979; Slope = -3,373

Tabela 7 Diluições em *Nuclease Free Water* do DNA padrão, média da Cp e das concentrações de DNA por μL Sistema TaqMan[®]

Diluição DNA padrão	Média do Cp	Cópias de DNA por μL
10^5	18,34	$1,02 \times 10^5$
10^4	22,1	$0,97 \times 10^4$
10^3	25,4	$1,03 \times 10^3$
10^2	29,2	$1,01 \times 10^2$
10^1	32,4	$0,99 \times 10^1$
10^0	35,3	$0,97 \times 10^0$

Posteriormente, submeteu-se as diluições do vírus padrão em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 (10^5 a 10^0 cópias de DNA/ μL), conforme item 4.2.4 deste trabalho, para realizar o limiar de detecção da prova e avaliar possíveis fatores de inibição presente no extraído. Obteve-se o limiar de detecção de 10^0 cópias de DNA/ μL , diluição na qual todas as amostras em triplicata, nas três reações feitas em dias diferentes, apresentaram resultados positivos (figura 24 e tabela 8)

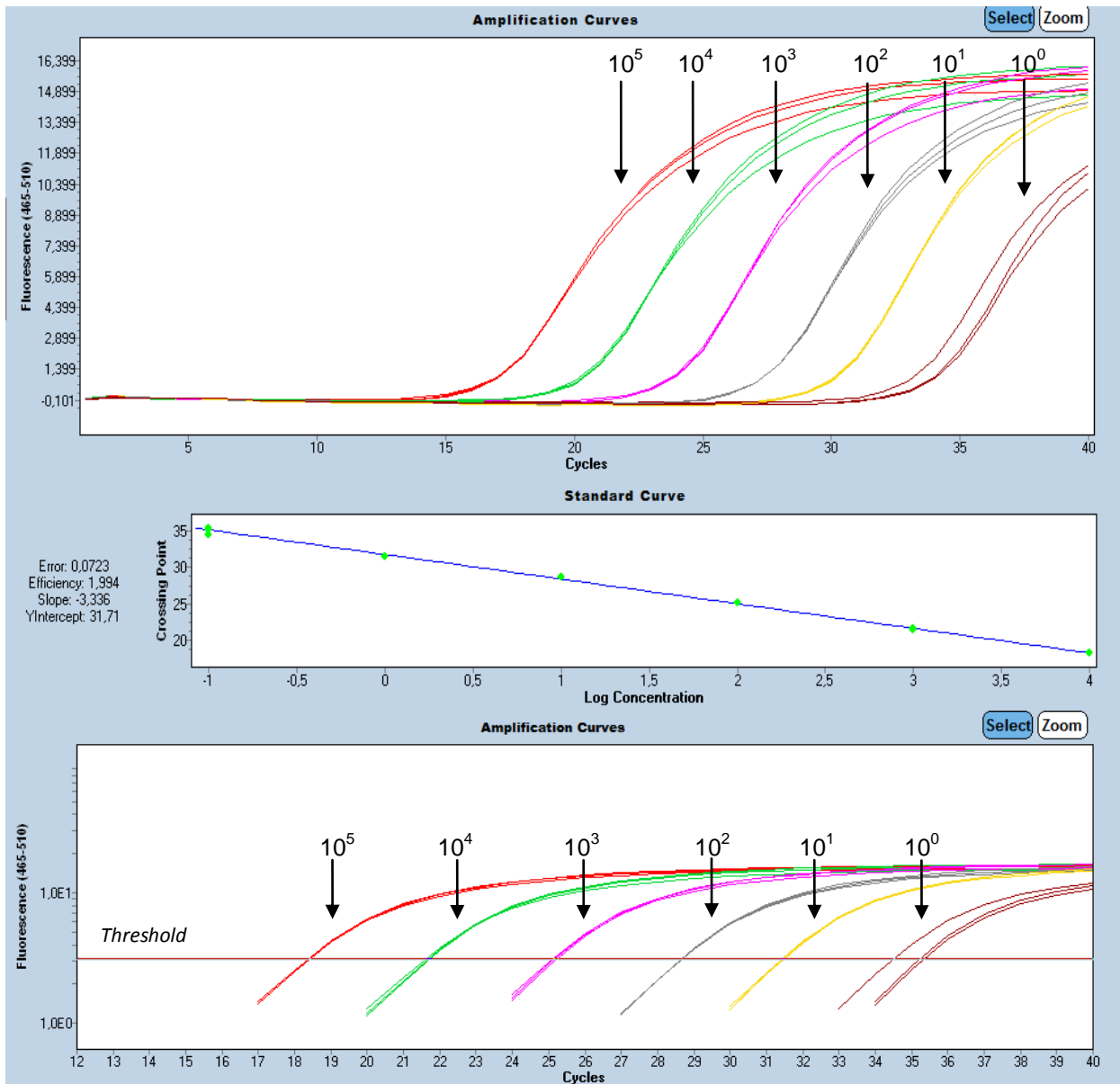


Figura 24 Curva padrão realizada com o sistema TaqMan®, diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 10^5 a 10^0 . Valores da reação: Erro = 0,0723; Eficiência = 1,994; Slope = -3.336

Tabela 8 Diluições em extraídos de SNC sabidamente negativos para o OvHV-2 do DNA padrão, média da Cp e das concentrações de DNA por μL - Sistema TaqMan®.

Diluição DNA padrão	Média do Cp	Cópias de DNA por μL
10^5	16,73	$0,98 \times 10^5$
10^4	20,3	$1,04 \times 10^4$
10^3	23,3	$1,01 \times 10^3$
10^2	27,1	$0,92 \times 10^2$
10^1	30,4	$1,05 \times 10^1$
10^0	34,8	$1,15 \times 10^0$

Os resultados das cinco amostras *in natura* sabidamente positivas para a FCM pelo histopatológico e cinco amostras *in natura* sabidamente negativas, submetidas em três reações feitas em três dias diferentes nas condições de reação padronizada, corresponderam ao esperado, indicando a validação e confiabilidade do uso da técnica na rotina laboratorial para diagnóstico da FCM associada a ovinos.

5.7 Análise das amostras

Das 285 amostras de sistema nervoso central de bovinos, com sintomas neurológicos e ou vesiculares encaminhadas aos laboratórios do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo, no período de janeiro de 2012 a março de 2014, obteve-se 4,2% (12/285) de amostras positivas, fora os quatro casos de 2009, e um caso de 2007 (tabela 9).

Tabela 9 Identificação e dados das amostras positivas pelas técnicas moleculares. *NI: Não informado

Identificação da amostra	Ano	Idade (meses)	Relação número de animais mortos ou doentes / rebanho	Cp	Número de cópias de DNA/ μ L	Número de cópias de DNA em 150mg de tecido	Resultado PCR qualitativa	Município/ estado
798/07	2007	96	1/21	26,41	$1,51 \times 10^2$	$226,5 \times 10^2$	POS	Assis/SP
G355/09	2009	36	2/350	26,84	$1,15 \times 10^2$	$172,5 \times 10^2$	POS	NI*/PE
G86/09	2009	48	3/530	24,63	$4,65 \times 10^2$	$694,5 \times 10^2$	POS	NI*/PE
G251/09	2009	3	NI*	26,45	$1,48 \times 10^2$	222×10^2	POS	Lagoa D'Ouro/ PE
1398/09	2009	56	1/150	30,86	$3,89 \times 10^1$	$583,5 \times 10^1$	POS	Martinópolis/SP
364/12	2012	38	NI*	29,73	$1,66 \times 10^1$	249×10^1	POS	Socorro/SP
11570/12	2012	84	NI*	35,23	$0,9 \times 10^0$	135×10^0	NEG	Caçapava/SP
24221/12	2012	18	1/100	30,94	$2,92 \times 10^1$	$139,26 \times 10^1$	POS	Ribeirão Preto/SP
20428/13	2013	36	NI*	24,07	$6,61 \times 10^2$	$991,5 \times 10^2$	POS	Bujari/ AC
5587/13	2013	48	NI*	35,22	$0,90 \times 10^0$	135×10^0	NEG	Franca/SP
6414/13	2013	24	1/29	32,54	$2,92 \times 10^1$	438×10^1	POS	Restinga/SP
7983/13	2013	48	5/350	33,27	$1,43 \times 10^1$	$214,5 \times 10^1$	POS	Itirapuã/SP
8011/13	2013	NI*	12/3106	33,61	$1,10 \times 10^1$	165×10^1	POS	Queiroz/SP
8012/13	2013	48	1/397	28,88	$3,94 \times 10^1$	591×10^1	POS	Morungaba/SP
8013/13	2013	5	1/254	33,50	$1,02 \times 10^1$	153×10^1	POS	Itaguaçu/ ES
25605/13	2013	48	1/350	33,71	$0,8 \times 10^1$	120×10^1	POS	Silva Jardim/RJ
2062/14	2014	36	3/144	34,99	$1,02 \times 10^0$	153×10^0	NEG	Itirapina/ SP

Das amostras positivas, 14 foram positivas tanto na PCR qualitativa como também na qPCR e 3 foram positivas na qPCR e negativas na PCR qualitativa (tabela 10).

Tabela 10 Comparação dos resultados obtidos entre as técnicas de PCR qualitativa e qPCR das 290 amostras testadas para OvHV-2.

		PCR qualitativa		Total
		Positivo	Negativo	
qPCR	Positivo	14	3	17
	Negativo	0	273	273
Total		14	276	290

Todos os animais listados na tabela 9 apresentavam quadro clínico neurológico. No entanto, aqueles positivos tanto na PCR convencional como qPCR apresentavam, ainda, sinais clínicos indicativos de FCM como tremor, depressão, ataxia, sialorreia, secreção nasal muco-purulenta, caquexia, hiperemia ocular, opacidade de córnea, pequenas ulcerações do focinho, incoordenação, fotofobia, agressividade, alterações do comportamento, cegueira, movimentos de pedalagem, entre outros.

Da amostra 20428/13 foram, tanto coletadas quanto analisadas separadamente, diversas partes do SNC, rim, fígado, leucócitos do sangue periférico, suabe nasal, olho e linfonodo, a fim de verificar a variação de positividade entre as amostras para averiguar a possível detecção do vírus em diversos tecidos alvos e obteve-se resultado positivo em todas amostras, tanto pela PCR qualitativa quanto qPCR (ambos sistemas).

Foram confrontados os resultados da PCR e histopatológico sendo que 47,05% (8/17) apresentaram lesões histológicas sugestivas de FCM, em menor e maior grau (amostras 798/07; G355/09; G86/09; G251/09; 364/12; 20428/13; 812/13 e 25605/13).

Essas lesões estão ilustradas nas figuras 25 à 31, fotos das lâminas histológicas da *rete mirabile* carotídea; córtex cerebral; cerebelo; tálamo; óbex e rim da amostra do município de Assis/SP, tida como vírus padrão neste estudo.

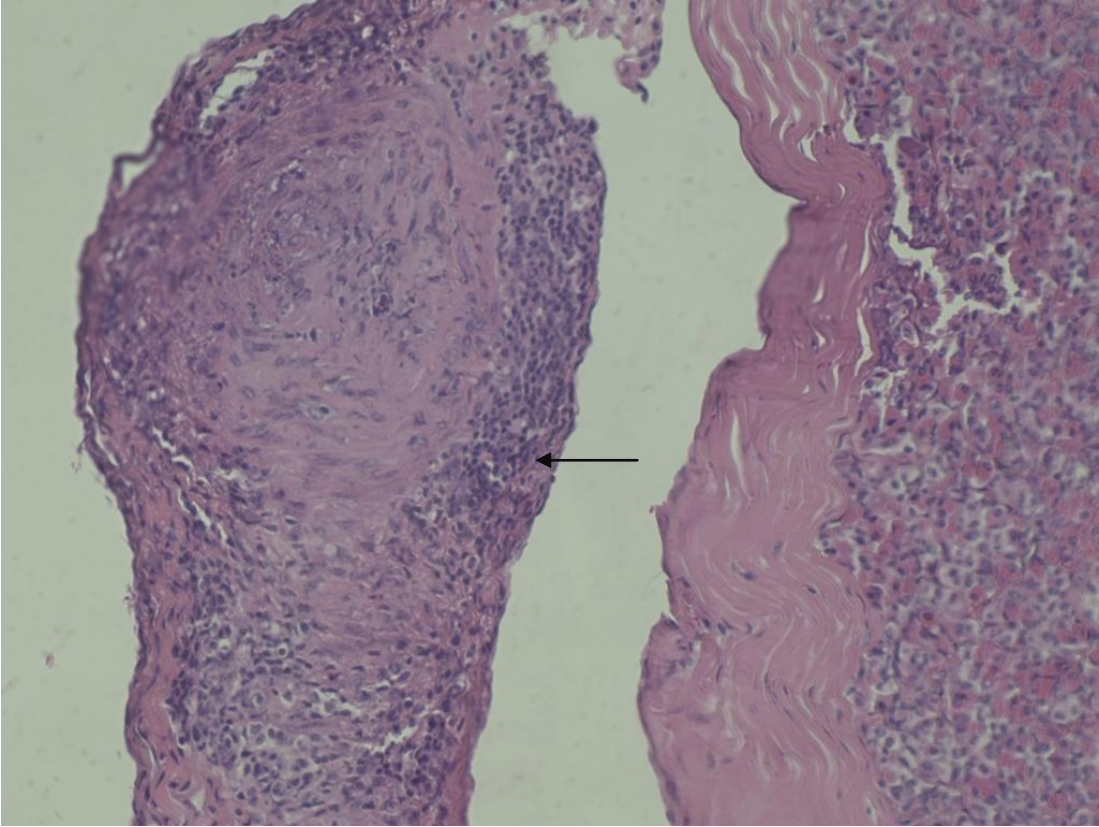


Figura 25 Rete mirabile carotídea com moderado infiltrado inflamatório mononuclear na túnica adventícia (HE, aumento 200X)

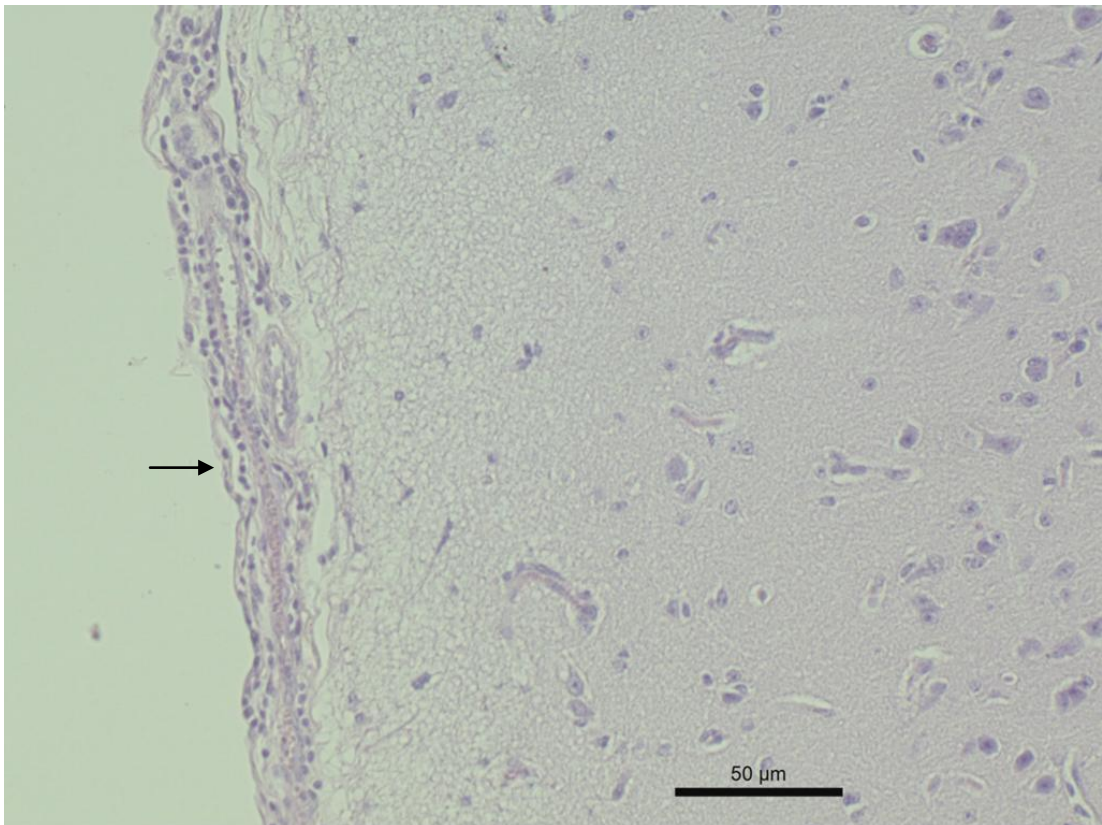


Figura 26 Córtex cerebral com discreto infiltrado mononuclear meníngeo (HE, aumento 200X)

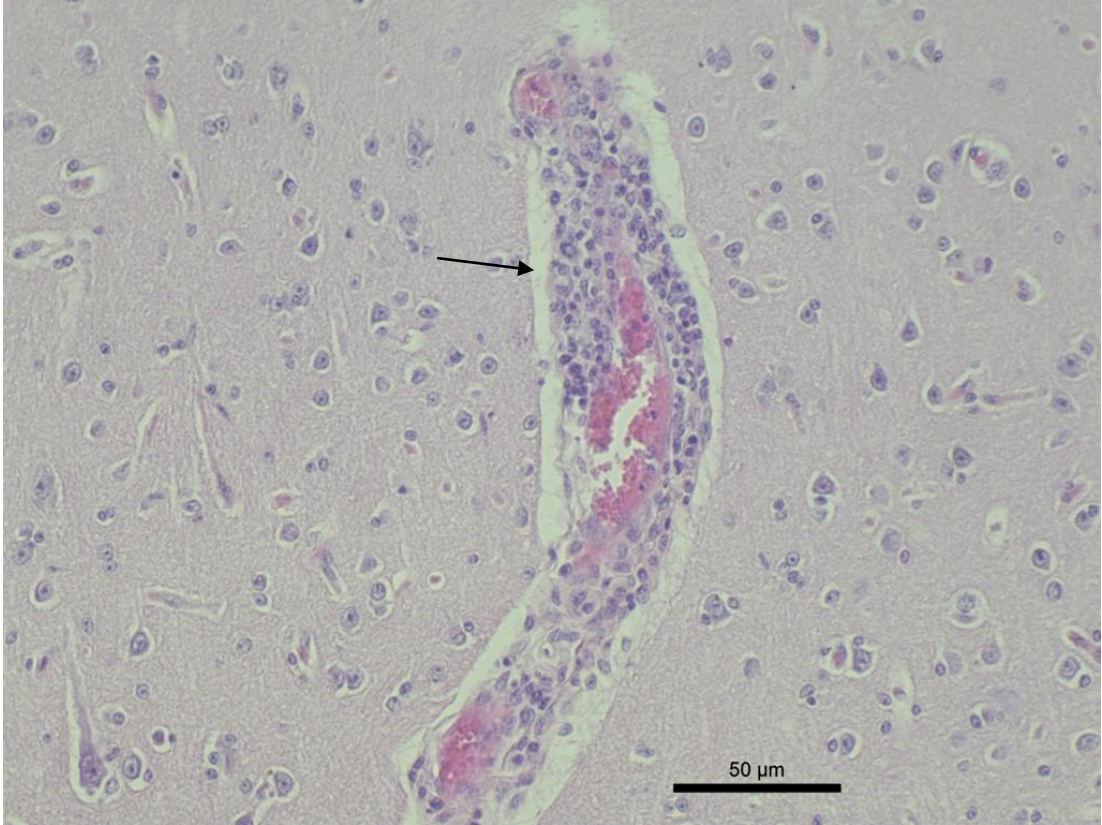


Figura 27 Córtex cerebral com moderado manguito perivascular mononuclear na substância cinzenta (HE, aumento 200X)

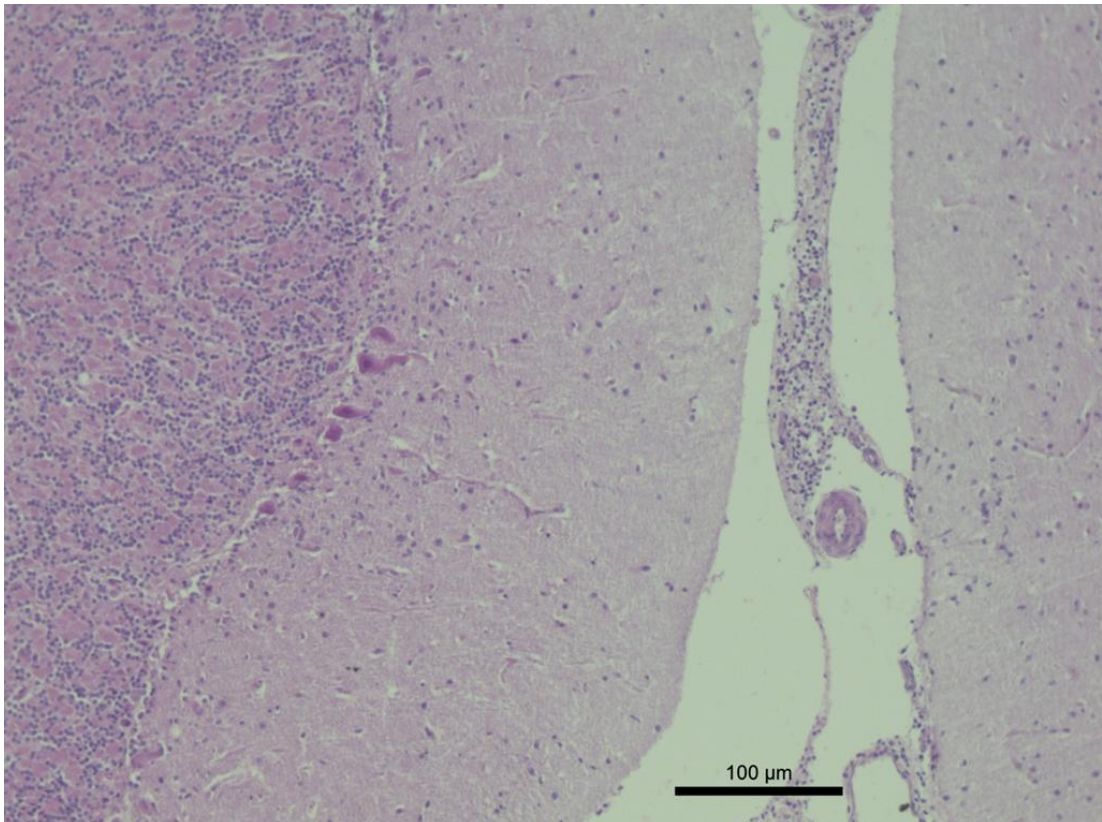


Figura 28 Cerebelo com moderado infiltrado mononuclear meníngeo (HE, aumento 100X)

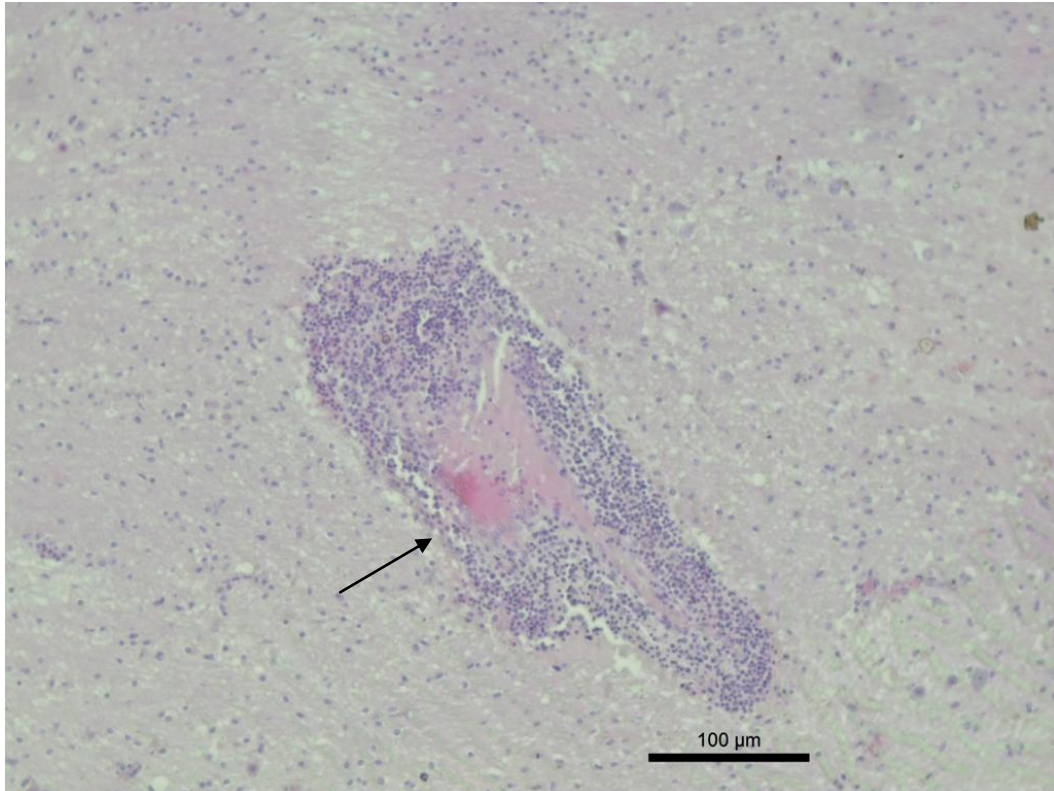


Figura 29 Tálamo com intenso manguito perivascular mononuclear no neurópilo (HE, aumento 100X)

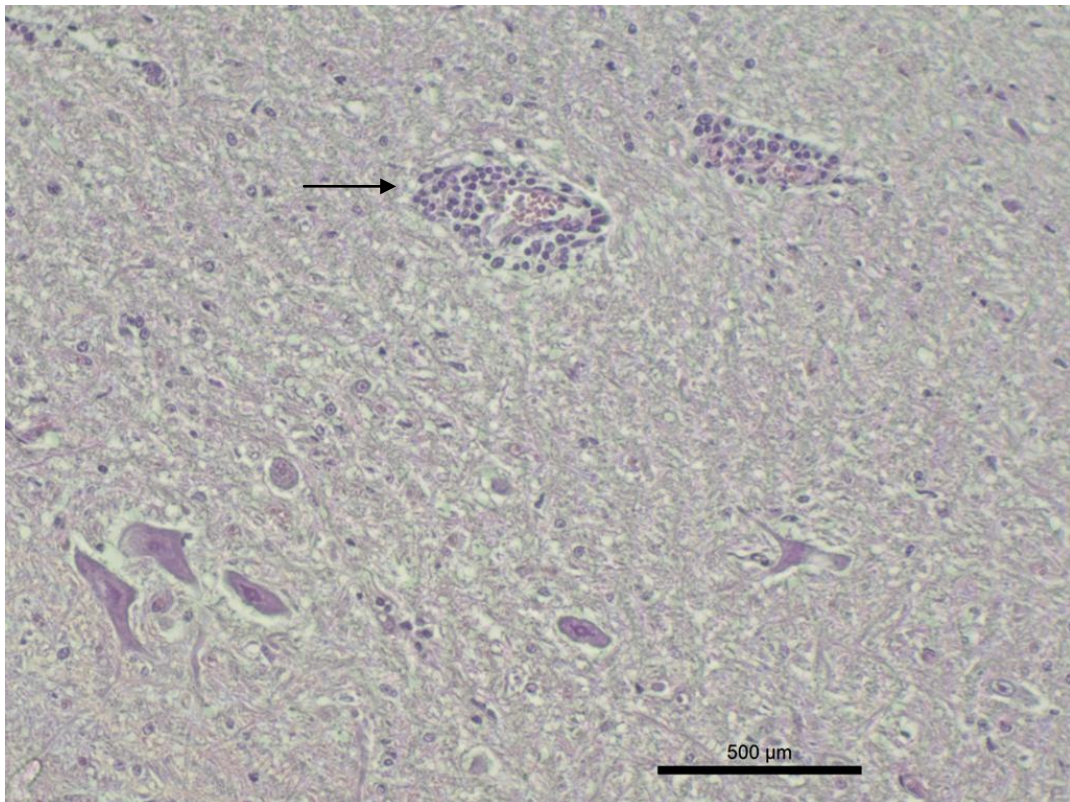


Figura 30 Óbex com moderado manguito perivascular mononuclear no neurópilo (HE, aumento 200X)

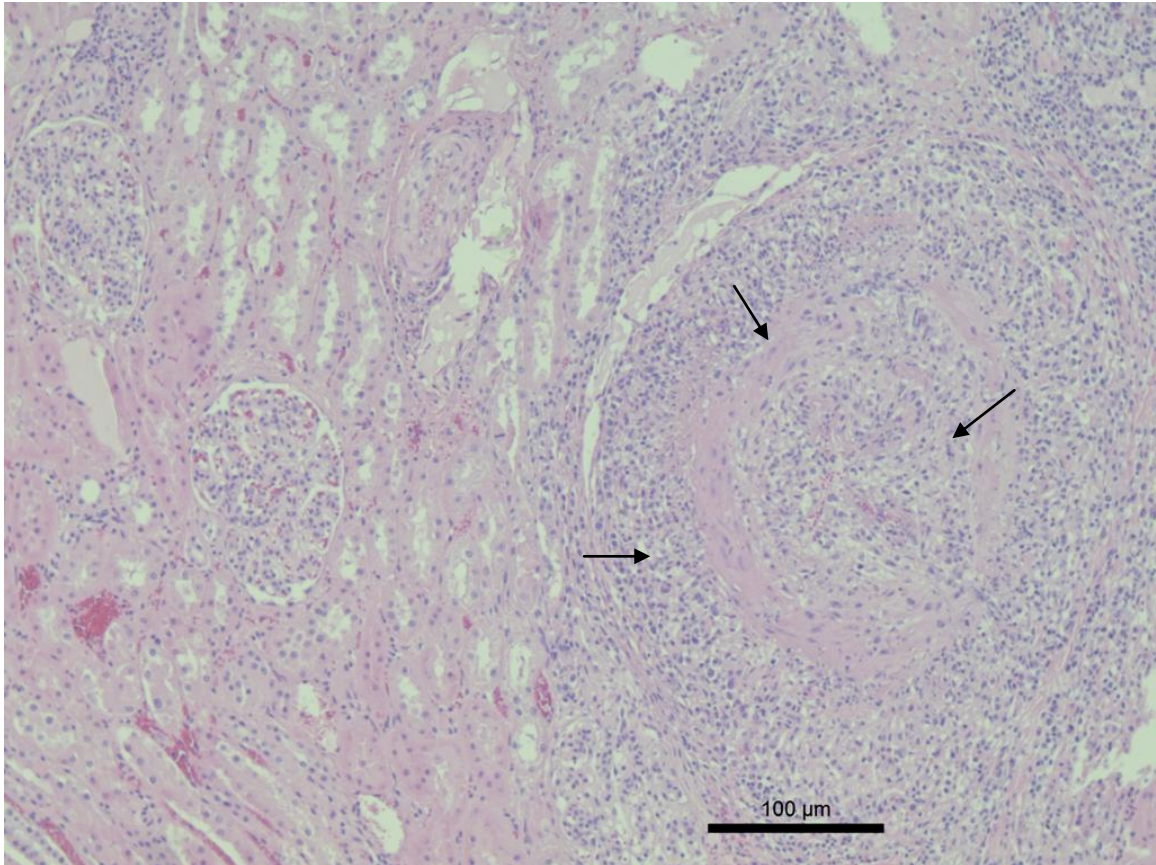


Figura 31 Rim. Cortical renal com intenso infiltrado inflamatório mononuclear na túnica média e adventícia e hialinização na túnica média (HE, aumento 100X).

Das amostras positivas nos métodos moleculares 52,94% (9/17) não apresentaram lesões histológicas sugestivas (amostras 1398/09; 24221/12; 6414/12; 11570/12; 7983/13; 5587/13; 8011/13; 813/13 e 2062/14). No entanto, vale ressaltar que a porção do SNC analisada, na maioria das amostras, não foi a de eleição para FCM (*rete mirabile* carotídea) e sim outras partes do SNC.

5.8 Análise das sequências de nucleotídeos e aminoácidos

As substituições de nucleotídeos e aminoácidos encontrados nas 13 amostras sequenciadas (Anexo 3) estão descritas no quadro 12.

Quadro 12 Amostras e as respectivas posições dos códons onde foram observadas substituições de nucleotídeos (negrito e sublinhado) e aminoácidos dentre as 13 amostras sequenciadas.

Amostras	Posição do códon	Substituição de nucleotídeos	Tipo de substituição	Substituição de aminoácidos
1398/09, 20428/13	14	G <u>T</u> C→G <u>T</u> I	Transição	Sem substituição
1398/09, 20428/13	35	C <u>A</u> G→C <u>A</u> A	Transição	Sem substituição
1398/09, 20428/13	38	<u>G</u> T <u>A</u> → <u>A</u> T <u>A</u>	Transição	Sem substituição
1398/09	59	<u>I</u> G <u>C</u> → <u>G</u> G <u>C</u>	Transversão	Sem substituição
24221/12, 25605/13	29	G <u>T</u> <u>A</u> →G <u>G</u> <u>A</u>	Transversão	Sem substituição
812/13	35	<u>C</u> <u>A</u> C→ <u>G</u> <u>A</u> C	Transversão	HIS→ASP
25605/13	29	G <u>T</u> <u>A</u> →G <u>G</u> <u>A</u>	Transição	Sem substituição
1398/09	59	<u>I</u> G <u>C</u> → <u>G</u> G <u>C</u>	Transversão	CYS→GLY
1398/09, 20428/13	161	<u>A</u> <u>A</u> A→ <u>G</u> <u>A</u> A	Transição	LYS→GLU
8012/13, 8013/13, 25605/13	225	<u>G</u> <u>C</u> T→ <u>A</u> C <u>T</u>	Transição	ALA→THR
8012/13, 8013/13, 25605/13	261	G <u>T</u> <u>G</u> →G <u>G</u> <u>G</u>	Transversão	VAL→GLY
8013/13,25605/13	264	<u>G</u> <u>C</u> A→ <u>C</u> <u>C</u> A	Transversão	Sem substituição
8012/13, 25605/13,7983/13	267	<u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> → <u>I</u> <u>C</u> <u>C</u>	Transição	ALA→SER
8013/13	267	G <u>C</u> <u>A</u> →G <u>C</u> <u>G</u>	Transversão	Sem substituição
7983/13	263	<u>G</u> <u>C</u> A→ <u>C</u> <u>C</u> A	Transversão	Sem substituição

A identidade entre as 13 amostras sequenciadas neste estudo variou 90,9% à 100%, e dessas com as sequências depositadas no GenBank (Alemanha, Ucrânia, Índia, África do

Sul e de diversos estados brasileiros) variou de 90,9 à 100%. As amostras 6414/13, 364/12; G251/09, 1398/09, G86/09, 798/07, 20428/13, 7983/13, G355/09, 24221/12 apresentaram um alto grau de identidade tanto entre si como entre as sequências obtidas no GenBank (98-100%). As amostras 8012/13 e 8013/13 apresentaram menor grau de identidade (95-97%) tanto entre si como entre as sequências obtidas no GenBank, sendo que a 25605/13 foi a que se observou menor grau de identidade (90,9-93,5%) conforme anexo 4.

Para a construção da árvore filogenética, baseada em distâncias entre sequências de caracteres, foi utilizado o algoritmo *Neighbor-joining* usando o modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros com *bootstrap* 1000 réplicas. Somente valores acima de 50% foram aceitos (figura 32).

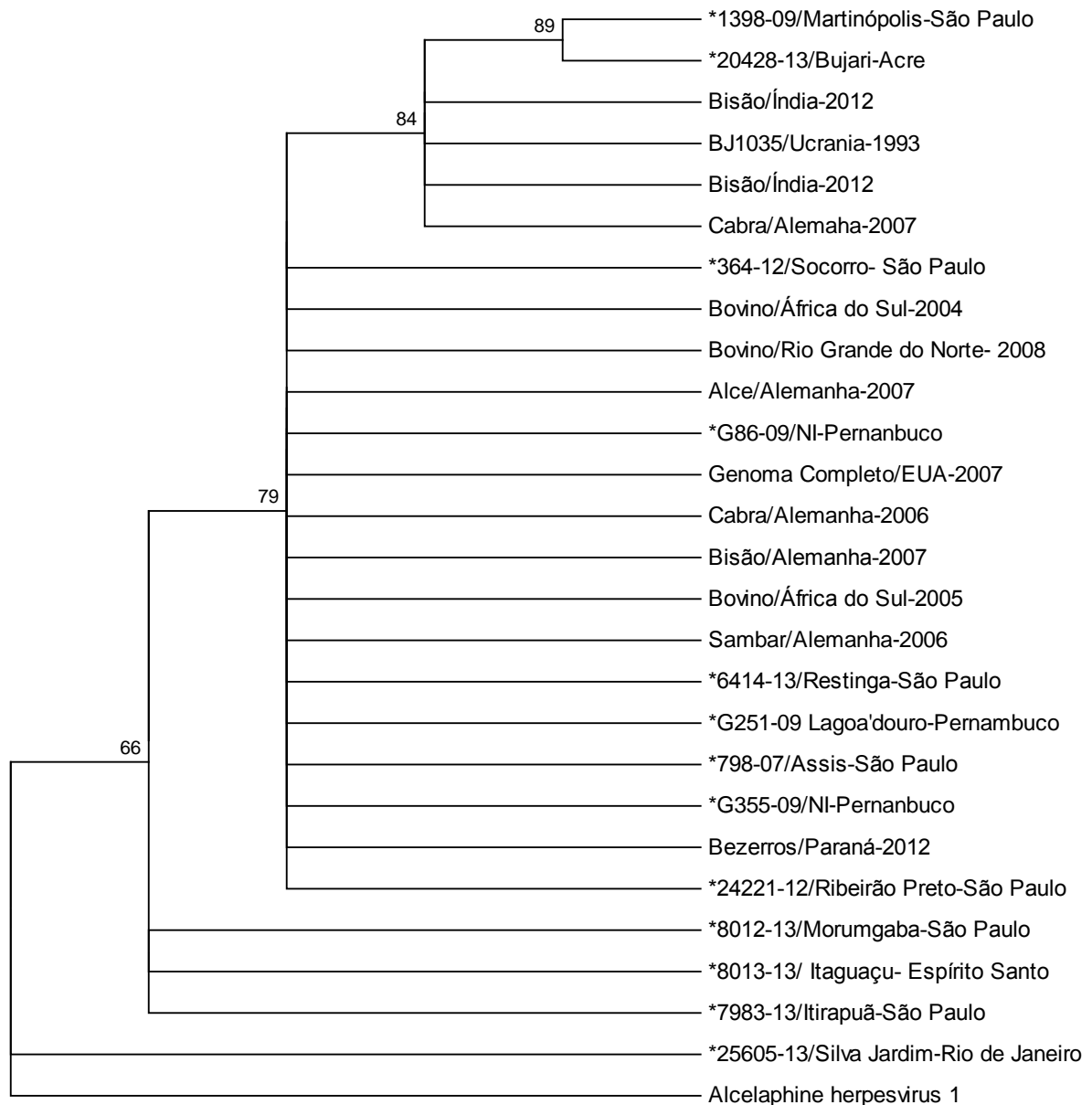


Figura 32 Filograma das sequências nucleotídicas obtidas neste estudo alinhadas com as sequências do OvHV-2 disponíveis no GenBank. A árvore foi construída pelo algoritmo *Neighbor-joining* usando modelo evolutivo Kimura 2 Parâmetros, com *bootstrap* de 1000 réplicas. *Amostras sequenciadas neste estudo.

Analisando-se a árvore filogenética, nota-se que, inicialmente, formam-se 2 grupos, sustentados por um *bootstrap* de 66%, um com amostras analisadas neste estudo de São Paulo e Espírito Santo do ano de 2013, e outro com todas as outras 11 amostras analisadas neste estudo e as sequências referências obtidas no GenBank.

Neste segundo grupo formam-se 2 subgrupos, suportados por um *bootstrap* de 79%, contendo a maior parte das amostras analisadas neste estudo (sete), de diversos estados brasileiros, além das sequências referências do GenBank de países diferentes, como Alemanha, África do Sul e Estados Unidos, e de hospedeiros diferentes, como cabra, bisão, bovino, entre outros.

Deste terceiro subgrupo formam-se outros 2, suportados por um *bootstrap* de 84%, com sequências da Índia, Ucrânia e Alemanha e, deste último, suportado por um *bootstrap* de 89% forma-se o subgrupo com amostras de São Paulo e Acre.

5.9 Isolamento viral em cultura celular

Foram realizadas 15 passagens em cultura celular de SNC, fígado, rim, olho e linfonodo de uma amostra de 2013, sabidamente positiva para OvHV-2, com concentração de aproximadamente $6,0 \times 10^2$ cópias de DNA/ μ L e com lesões histopatológicas características da FCM. Não parou-se na 3^o passagem, como geralmente é preconizado no isolamento viral, por se tratar de um vírus com histórico, na literatura, de difícil isolamento *in vitro*. Nas 15 passagens não foi observado efeito citopático, permanecendo assim o tapete celular íntegro (figura 33).

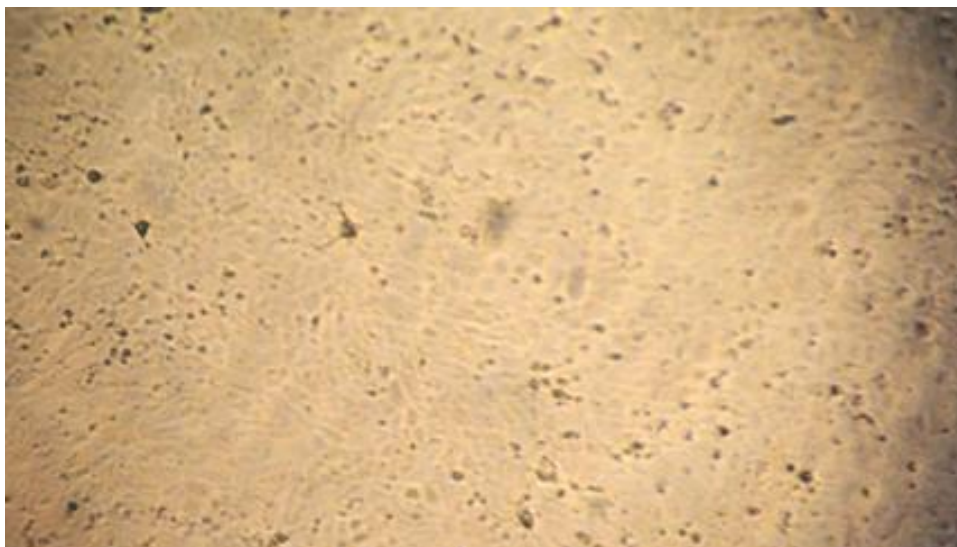


Figura 33 Monocamada de células MDBK sem efeito citopático.

Justamente por não haver muitos dados de isolamento do OvHV-2 em cultura celular, não há a certeza se o mesmo causa efeito citopático. Por esse motivo, foi realizado qPCR, sistema TaqMan[®], de todas as passagens realizadas, para averiguar se houve aumento do título viral. Observou-se que da 1^o para a 2^o passagem houve um pequeno aumento do título viral, porém nas passagens seguintes não se detectou a presença do vírus. Na figura 34 encontra-se o resultado obtido do SNC. Obtiveram-se resultados semelhantes em amostra de fígado, olho, rim e linfonodo. Vale ressaltar que se repetiu a 1^o, 2^o, 3^o, 4^o e 5^o passagem e obteve-se o mesmo resultado.

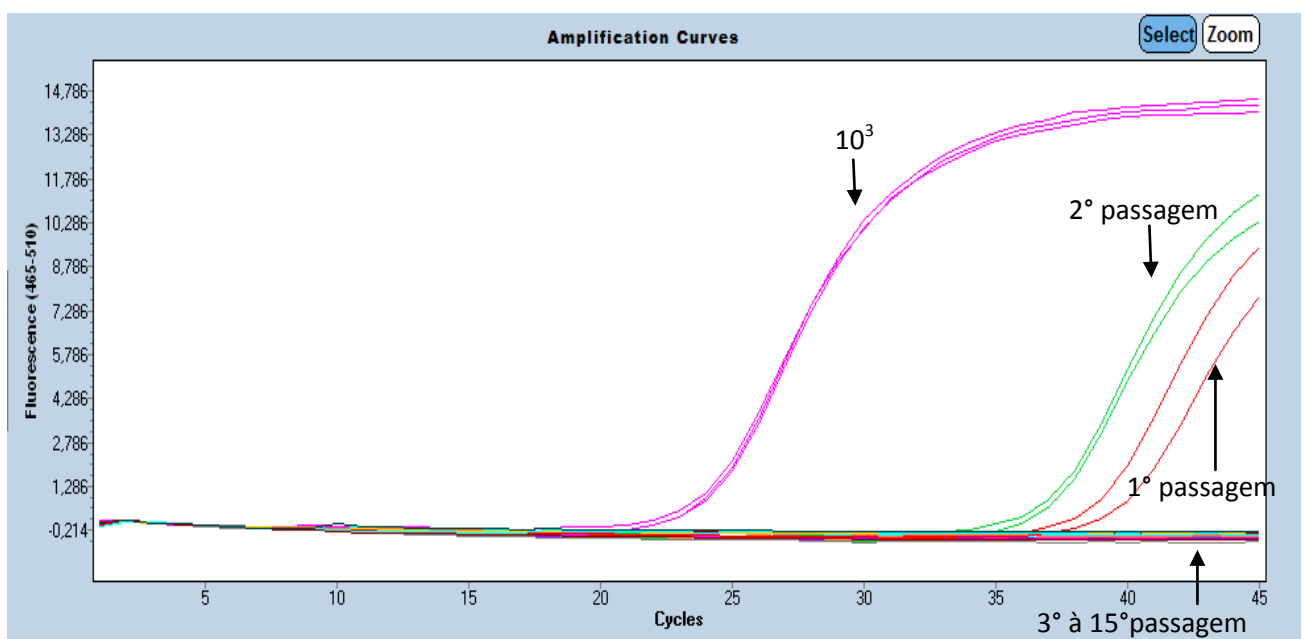


Figura 34 Reação qPCR, sistema TaqMan[®], das 15 passagens em cultura celular de SNC positivo para OvHV-2 e controle positivo 10³ cópias de DNA/μL.

6. DISCUSSÃO

6.1 Extração material *in natura*

Dos protocolos de extração testados para material *in natura* (DNAzol[®] (Invitrogen), Trizol[®] (Invitrogen) e Wizard[®] Genomic DNA Purification kit (Promega)), o mais eficiente foi o Trizol[®], no qual obteve-se maior intensidade de banda e o único que obteve-se repetibilidade (triplicata no mesmo dia) e reprodutibilidade nos três procedimentos realizados em três dias diferentes.

O protocolo do DNAzol[®], apesar da facilidade da execução e de ser um método rápido e prático, assim como o Wizard[®] Genomic DNA Purification kit, não produziram bons resultados, pois em ambos não houve repetibilidade e reprodutibilidade do método, uma vez que houve diferenças na intensidade de banda e não amplificação em dias diferentes. Por este motivo elegeu-se o Trizol[®] como método de extração padrão para OvHV-2 neste estudo, pois houve reprodutibilidade além da boa qualidade do DNA extraído. No entanto, por ser tóxico, sua manipulação exige cuidados nos processos laboratoriais.

6.2 Extração material parafinado

A extração do DNA de amostras emblocados em parafina é de grande importância, tanto para estudos *post-mortem* retrospectivos da epidemiologia molecular e análise sobre a evolução viral através do tempo. No entanto, o sucesso da extração do ácido nucleico de tal material é um grande desafio. Inúmeros empecilhos decorrentes do processamento do material comprometem a qualidade do DNA, como o tempo de prefixação, fixação, fragmentação do DNA e temperatura de processamento do material. Além do que, o modo como esse material foi preparado pelo histologista é um fator crucial para o não comprometimento da amostra para processos moleculares.

Assim, os processos histológicos causam alterações significativas na estrutura e constituição do DNA, que atuam de forma negativa nos passos subsequentes a extração, como PCR qualitativa e qPCR.

O formol é um ótimo fixador, no qual tecidos podem permanecer por mais de 10 anos sem significativas modificações na sua estrutura. No entanto, quando exposto a luz, o formol

se transforma em ácido fórmico, provocando redução do pH do material, alteração desfavorável às técnicas moleculares. Estudos químicos feitos entre formaldeído e ácido nucleico demonstraram que a reação básica entre eles é similar à observada na interação entre formol e proteína, onde há quebra de ligações de ponte de hidrogênio e desligamento de bases em regiões ricas em adenina e timina da dupla fita de DNA, desnaturando-o e criando novas interações químicas (SCORSATO; TELLES, 2011).

Contudo, a extração do DNA de material embocado em parafina tem-se apresentado uma opção variavelmente bem sucedida. Existem, na literatura, inúmeros protocolos, sendo que o método mais frequentemente utilizado é a desparafinização da amostra com o auxílio de calor e/ou solvente orgânico.

A qualidade dos cortes do tecido para a extração é um dos passos que interferem no procedimento, estes devem conter a mínima quantidade possível de parafina, sendo necessária a remoção do excesso manualmente, antes da desparafinização.

No protocolo descrito por Chan et al. (2001), a remoção da parafina é feita somente pela ação do xilol (solvente), o que não deu certo em primeiro teste de extração. Neste trabalho, para aperfeiçoar, atrelou-se tanto a remoção por lavagens em xilol como também o uso do calor, aquecendo o solvente a 65°C (para fundir a parafina) melhorando assim a penetração do solvente na amostra.

Como o xilol inibe a ação da proteinase K (utilizado em etapa posterior, na extração) é necessária a remoção deste do tecido. Para isso utilizam-se lavagens em etanol. Para melhorar a digestão do tecido é necessário hidratá-lo. Para isso fez-se a retirada do xilol em banhos com porcentagens decrescente de etanol, outra adaptação feita no protocolo recomendado por Chan et al.(2001). A partir do material hidratado inicia-se a lise do tecido.

Até este ponto (desparafinização), todos os protocolos testados neste estudo tem praticamente o mesmo princípio, incluindo os kits comerciais, diferindo assim o modo da digestão.

O protocolo recomendado por Chan et al. (2001) utiliza o detergente SDS combinado com a proteinase K, realizando digestão enzimática, que apresentou resultado eficiente na extração. O método de purificação utilizado foi o padrão fenol/clorofórmio, baseado na diferença de solubilização de ácidos nucleicos, proteína e lipídio onde, na fase aquosa, encontra-se o DNA. Este método também foi eficiente, no entanto, por ser tóxico, sua manipulação exige cuidados e necessita de várias fases no processo laboratorial. Apesar do sucesso da extração deste protocolo, o mesmo não apresentou repetibilidade.

O protocolo recomendado por Nascimento et al. (2003) utiliza o Wizard Genomic DNA Purifications Kit (Promega) para digestão do tecido e purificação do extraído, no qual obteve-se um DNA fragmentado e inibidores de PCR.

Quanto aos kits de extração, mesmo com a visita e acompanhamento técnico da empresa fornecedora, não se obteve sucesso na extração do DNA, sendo que NucleoSpin® FFPE DNA (Macharey- Nagel), Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (STRATEC Molecular), não foi eficiente na extração do DNA, DNA Mini Kit (Analytik Jena) e o QIAamp DNA FFPE kit (QIAGEN) obteve-se arrasto na eletroforese, indicando que houve fragmentação e má qualidade do DNA obtido. No Hight Pure FFPE DNA Isolation Kit (Roche Molecular Systems, Foster City, CA), não se obteve curva na qPCR.

Outro fator que interfere no sucesso da extração de material parafinado é o tempo de fixação e embocamento do tecido. Crawford et al (1999) relataram que sinais de PCR foram detectados a partir de tecidos fixos por período de até 45 dias. Daí em diante, o número de tecidos produzindo sinais positivos diminuiu progressivamente. Talvez por esse motivo que neste trabalho não se obteve tanto sucesso na extração de material parafinado, por se tratarem de amostras fixas e embocadas a, no mínimo, cinco anos.

Além de tudo já dito, também existe a possibilidade da ausência do vírus nas lesões histológicas características da FCM ou no corte realizado, sendo este o motivo da não amplificação do gene alvo e não o insucesso da extração.

6.3 Padronização e validação da PCR qualitativa e qPCR

A FCM em bovinos é frequentemente diagnosticada, no Brasil, pelos sinais clínicos, achados de necropsia e histopatologia (TORRES, 1924; DÖBEREINER; TOKARNIA, 1959; BARROS et al., 1983; MARQUES et al., 1986; BAPTISTA; GUIDI, 1998; DeMARTINI, 2000; SILVA et al., 2001; SOUSA et al., 2009).

No entanto, o diagnóstico da FCM feita pelos sinais clínicos, nem sempre é confiável, uma vez que podem ser confundíveis com outras doenças e, nos achados de necropsia e histopatologia, pode não haver as lesões características, além do que nos dois últimos é indispensável que haja a morte do animal, subdiagnosticando assim a doença. Investigações recentes, por métodos moleculares e imunodiagnóstico, parecem confirmar que alguns animais infectados podem se recuperar depois de leve ou mesmo muito grave quadro clínico. Alguns estudos indicam que um número significativo de animais pode tornar-se infectado, sem desenvolver a doença clínica (OIE, 2013).

Assim a técnica da PCR é uma ótima opção para o diagnóstico da FCM. Suas vantagens incluem: a técnica pode ser utilizada tanto no exame *ante-mortem*, permitindo a detecção precoce do agente causal da FCM propiciando atendimento em tempo oportuno evitando perdas econômicas, como *post-mortem*, tem grande sensibilidade e especificidade;

permite diagnosticar casos de FCM que não apresentem todos os sinais clínicos clássicos, como os casos crônicos com recuperação da doença clínica e a aplicação da técnica em tecidos fixados e emblocados em parafina pode ser utilizada para caracterizar o agente, especialmente em estudos retrospectivos (GARMATZ et al., 2004).

Por este motivo que padronizou-se e validou-se, neste trabalho, a técnica de PCR qualitativa e qPCR para o OvHV-2.

O controle positivo utilizado para determinar a sensibilidade analítica da técnica foi uma amostra proveniente de um caso diagnosticado pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos e Laboratório Anatomia Patológica do Instituto Biológico em 2007 da cidade de Assis, Estado de São Paulo (SP). O fato de ser utilizada uma amostra brasileira para a validação é de grande importância e é um fator crucial, pois o grande alvo é o diagnóstico de variantes e casos brasileiros do vírus. No entanto, com o sequenciamento desta amostra obteve-se homologia de 98-100% com isolados tanto do Brasil como outras partes do mundo, evidenciando a confiabilidade do uso desta amostra como controle e determinação do limiar de detecção da prova, pois esta pode representar as variantes circulantes no Brasil e possivelmente no mundo.

Utilizou-se diluições seriadas para determinação da sensibilidade analítica tanto da PCR qualitativa como da qPCR.

A PCR qualitativa apresentou um limite de detecção de aproximadamente 10^1 cópias de DNA/ μ L na primeira amplificação da *semi-nested* PCR e 10^2 cópias de DNA/ μ L na segunda amplificação, o que representa uma boa sensibilidade analítica em ambas as amplificações.

A *Semi-Nested* PCR busca melhorar a sensibilidade e a eficiência da reação a partir do segmento genômico, amplificando primeiro de forma abrangente, copiando até mesmo sequências localizadas fora da sequência-alvo e depois, utilizando este primeiro produto, a amplificação da real sequência-alvo. Estas duas etapas são realizadas separadamente, em duas reações, caracterizando a *Semi-Nested* PCR (VIEIRA, 2008). No entanto esta oferece vantagens e desvantagens. Ao aumentar a sensibilidade e a especificidade da primeira etapa a partir da segunda, a técnica se apresenta como uma alternativa vantajosa em relação à reação de PCR qualitativa com apenas uma etapa de amplificação. Além disso, a transferência do primeiro produto amplificado serve para diluir inibidores de PCR que eventualmente possam estar presentes na amostra inicial. Todavia, há também desvantagens, por depender de mais tempo, mais reagentes, oferecer maior risco de contaminação por manipulações excessivas do *amplicon* no laboratório, além de aumentar o risco da não detecção de variantes OvHV-2 (PERSING, 1993; REBOUÇAS, 2001).

Neste estudo, foram avaliados as vantagens e desvantagens de se manter a *Semi-Nested* para detecção do OvHV-2. Comumente a *Semi-Nested* torna a reação mais sensível

e específica. No entanto constatou-se um limite de detecção 10X menor quando realizada as duas amplificações que, aliado ao maior tempo de execução, maiores custos (devido ao uso de mais reagentes), e principalmente, maiores do risco de contaminação (decorrente das manipulações excessivas do *amplicon* no laboratório) não justificariam o seu uso.

Utilizando-se os *primers* 556 e 555 (segunda amplificação), após o gradiente de temperatura, obteve-se um limiar de detecção 10^3 cópias de DNA/ μ L e utilizando-se os *primers* 556 e 755 (primeira amplificação), obteve-se um limiar de detecção de 10^1 cópias de DNA/ μ L. Esta diferença de sensibilidade das amplificações deve-se provavelmente a diferença de temperatura de *Melting* dos *primers* (755: 56,6°C; 556: 61,8°C e 555: 66,9°C).

Como o fragmento obtido na primeira amplificação, apesar de mais amplo, é específico e não cruza com outros vírus ou sequências genômicas (verificado no BLAST com o sequenciamento do fragmento de 422 pb da primeira amplificação da amostra padrão) e o limiar de detecção é boa (10^1 cópias de DNA/ μ L), definiu-se como padrão o uso somente da primeira amplificação, utilizando os *primers* 556 e 755 na detecção do OvHV-2 e o uso da *Semi-Nested* somente em casos específicos a serem avaliados. Esta decisão corrobora com Headley et al. (2012) que também eliminou a segunda amplificação para detecção do OvHV-2 em seu estudo.

A concordância entre as triplicatas e os resultados das amostras sabidamente positivas e negativas demonstrou a validação da PCR qualitativa, o que atendeu as expectativas devido à alta sensibilidade analítica, sendo que os resultados obtidos justificam a sua introdução na rotina laboratorial para pesquisa do vírus em diversos órgãos alvos do OvHV-2, leucócitos do sangue periférico e suabe.

No entanto, o uso de PCR qualitativa como método de rotina para confirmação clínica de FCM nos laboratórios de diagnóstico pode ser problemático, devido a ser susceptível a significativa contaminação do *amplicon* e ser mais demorado se comparado com a PCR quantitativa.

Sendo assim, a PCR quantitativa pode tornar-se o teste de escolha, por ser realizada em um sistema fechado, a leitura é feita através da captação de fluorescência, obtenção de resultados automatizados, além de permitir a quantificação dos fragmentos de interesse e o acompanhamento das reações em tempo real. Esse método eliminou etapas e há a diminuição do risco de contaminação das amostras e resultados falso-positivos, além de evitar o uso de soluções mutagênicas, como brometo de etídeo.

A sensibilidade analítica da qPCR, tanto pelo sistema SYBR[®]Green como TaqMan[®] foi de 10^0 cópias de DNA/ μ L, o que representa uma alta sensibilidade analítica. Esta é 10X maior que a sensibilidade analítica da PCR qualitativa, padronizada neste trabalho, o que é esperado, pelo fato da qPCR ser uma técnica mais sensível e específica que a PCR qualitativa.

A curva padrão, tanto pelo sistema SYBR[®]Green como TaqMan[®], foi gerada através do ponto de corte dos valores do *Threshold Cycler* (Ct) em fase linear logarítmica de amplificação frente diluições do vírus, para calcular o coeficiente angular da reta (*slope*) e para calcular a eficiência da amplificação (*E*), e estes ficaram dentro do padrão (*slope* de aproximadamente -3,3 e eficiência de aproximadamente 2,0), o que indica a validação e padronização de ambas as técnicas.

Para a precisão inter-ensaio e intra-ensaio, foi avaliado o coeficiente de variação do Ct obtidos para cada diluição padrão, testado em três reações independentes e, como não houve variação significativa dos Ct, conclui-se que se trata de reações precisas. Tanto o sistema SYBR[®]Green como TaqMan[®] apresentaram repetibilidade e reprodutibilidade, pois não houve variação da curva padrão inter-ensaio nas três corridas independentes, em triplicada.

Não houve diferença significativa de sensibilidade das diluições realizadas em *Nuclease Free Water* e extraídos de SNC sabidamente negativos para OvHV-2, indicando que não há inibidores de PCR e, portanto, a extração feita com Trizol[®] é uma boa opção para a realização da qPCR, tanto sistema SYBR[®]Green como TaqMan[®].

Hua et al. (1999) relataram a sensibilidade analítica de 30 cópias de DNA/ μ L no seu ensaio, no entanto, ele utilizou sequências de *primers* e *sonda* diferentes das utilizadas neste estudo. Hüßy et al. (2001), em reação de qPCR (sistema TaqMan[®]) utilizaram as mesmas sequências de *primers* e *probe* deste trabalho, e obteve uma sensibilidade analítica de 10 ou mais cópias de DNA/ μ L (Ct de aproximadamente 40) e Traul, et al. (2007), em sua reação, foi capaz de detectar até 50 cópias de DNA/ μ L. Assim, a sensibilidade analítica obtida neste estudo foi superior a dos trabalhos referidos, o que demonstra otimização na reação sistema TaqMan[®] e sua confiabilidade para detecção do OvHV-2, tanto pela alta sensibilidade analítica, como pela reprodutibilidade e linearidade da reação.

Embora não se encontrou na literatura estudos de FCM realizados com sistema SYBR[®]Green, os resultados obtidos neste estudo sugerem que este seja um método confiável e seguro para detecção do OvHV-2, porque, assim como o sistema TaqMan[®], apresentou uma boa sensibilidade analítica, reprodutibilidade e linearidade na reação, além da especificidade, verificada pela curva de *Melting*.

Os resultados obtidos justificam a possível introdução da qPCR, tanto sistema TaqMan[®] como também sistema SYBR[®]Green, na rotina laboratorial para pesquisa do vírus em diversos órgãos alvos do OvHV-2, leucócitos do sangue periférico e suabe.

Apesar dos resultados obtidos serem satisfatórios, é de grande importância constantes monitoramentos para verificar o desempenho dos testes moleculares, uma vez que haja a possível introdução sorotipos diferentes, aliada a novas partidas de reagentes e *primers*, o que podem alterar os resultados.

6.4 Análise das amostras positivas

A FCM ocorre naturalmente, na maioria das vezes, de forma esporádica, afetando poucos animais do rebanho e, geralmente, leva este animal à morte. Fato este comprovado pelos resultados obtidos neste estudo, sendo que o OvHV-2 apresentou baixa frequência (5,86%), incluindo, nesta porcentagem, possíveis animais portadores do vírus (aqueles que apresentam o vírus latente). É uma doença que, como visto na tabela 9, independe da idade, raça ou sexo do animal.

O sistema brasileiro de vigilância da EEB conta com um laboratório de referência Nacional (Lanagro/PE) e quatro laboratórios credenciados que atendem principalmente a região em que estão situados (Laboratório de Anatomia Patológica IB/SP, Centro de Diagnóstico “Marcos Enrietti CDME/PR, Laboratório do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA)/MG e Lanagro/ PE). Tendo em vista que a amostragem examinada pertence ao banco de amostras de bovinos acometidos por doença neurológica estocado no LVB/IB e Laboratório de Anatomia Patológica/IB e este faz parte do sistema de vigilância do estado de São Paulo, justifica a maioria das amostras positivas serem do estado de São Paulo, pois tendência os resultados não significando, dessa forma, que no estado de São Paulo a frequência de animais com FCM seja maior. Na maioria das propriedades com amostra positiva, era feita a criação consorciada de bovinos e ovinos, fator de risco para a FCM ovino-associada.

Como esperado, houve mais amostras positivas na qPCR do que na PCR qualitativa. Isso se deve, provavelmente, a diferença de sensibilidade entre as técnicas, uma vez que a sensibilidade analítica da PCR qualitativa é de 10^1 cópias de DNA/ μ L e da qPCR é de 10^0 cópias de DNA/ μ L (ambos sistemas), ou seja, a qPCR é 10X mais sensível que a PCR qualitativa, fato este provado pela concentração de DNA viral das amostras negativas na PCR qualitativa e positivas na qPCR (concentração estas abaixo de 10^1 cópias de DNA/ μ L).

As amostras com maior número de partículas virais (superior a 10^1 cópias de DNA/ μ L) apresentaram lesões histológicas características da FCM. No entanto, amostras com concentrações mais baixas (inferior 10^1 cópias/ μ L) não apresentaram lesões histológicas, o que é esperado, uma vez que, geralmente e dependendo da virulência, a concentração do vírus em um organismo é diretamente proporcional ao efeito que este causa nele.

Vale ressaltar que, na maioria das amostras, não foi analisada, tanto pelos métodos moleculares como pela histologia, *rete mirabile* carotídea, amostra de eleição para FCM. Talvez por esse motivo não se observou lesões histológicas características em algumas amostras. Esta observação demonstra a importância da implantação do diagnóstico molecular, mais sensível, específico, ágil e seguro do que outros métodos, facilitando assim

a detecção do OvHV-2, tornando-a possível em diferentes órgãos alvos e fluidos (não só a *rete mirabile* carotídea) e em baixos títulos virais, além de ser possível o diagnóstico *ante-mortem* em leucócitos do sangue periférico, por exemplo, não havendo a necessidade da morte do animal.

Também alerta para a importância da coleta e envio do material correto para o diagnóstico histológico, uma vez que o patologista não recebe, na grande maioria das vezes, o material adequado para o diagnóstico da FCM (*rete mirabile* carotídea), sendo inviável confirmar o caso por histopatologia, subdiagnosticando assim a doença. O diagnóstico molecular é fundamental nesses casos, pois apresenta bom desempenho para detectar o agente em vários órgãos e fluidos, porém deve-se sempre associar positividade da PCR e lesões teciduais microscópicas, a fim de interpretar corretamente a análise laboratorial, diferenciando a infecção viral latente de ativa, para o OvHV-2, pela presença de lesões teciduais associadas à presença do agente viral.

Os achados deste estudo confirmam a necessidade de provas de diagnóstico específicas para identificação do agente da FCM nos casos de transtornos nervosos, já que não houve concordância entre os achados histopatológicos e moleculares, levando a resultados falso-negativos quando é realizada apenas a análise histológica em materiais onde não se foi coletada nem enviada para análise histopatológica a *rete mirabile* carotídea. Ressalta-se sempre que o ponto crítico do diagnóstico acaba sendo a coleta de amostras, sendo necessário o treinamento de veterinários na realização desta tarefa, havendo literatura especializada disponível para esta consulta (PITUCO et al., 2010).

Não é possível, afirmar pela PCR positiva, que a causa da morte do animal foi devida ao agente causador da FCM, tendo em vista que infecções latentes podem ser detectadas. No entanto, esta informação é fundamental na vigilância epidemiológica da doença.

Analisando-se a árvore filogenética desde estudo e o grau de identidade entre as amostras, sugere-se que, possivelmente, o OvHV-2 circulante no Brasil é semelhante aos circulantes no mundo, pois foram analisadas amostras de diversos continentes, em diferentes anos e de diferentes hospedeiros e não observou-se grande variação genômica. Este achado demonstra a confiabilidade do uso da PCR qualitativa e qPCR direcionada ao ORF75, padronizada e validada neste estudo, no diagnóstico da FCM ovino-associada.

6.5 Isolamento viral em cultura celular

O OvHV-2 já foi transmitido experimentalmente para coelhos e *hamsters*, que desenvolvem lesões característica da FCM (OIE, 2013). No entanto, vários estudos relatam a dificuldade de se isolar o OvHV-2 em cultura celular.

Contudo, Bastawecy et al. (2012) obtiveram sucesso no isolamento em cultura celular a partir do epitélio lingual de bovino e búfalo, naturalmente infectado, com FCM, no Egito.

No presente estudo, não se obteve sucesso no isolamento do OvHV-2 em cultura celular, mesmo realizando 15 passagens celulares. O insucesso do isolamento foi comprovado na qPCR, onde se observou um aumento do título viral até a 2ª passagem, negativando nas passagens seguintes. O mesmo resultado observou-se nas repetições.

Taus et al. (2005), descreveram diferenças genéticas do vírus obtidos a partir de secreção nasal de ovelhas infectadas e de células T do leucócitos de sangue periférico de bovinos com FCM. Diferenças essas em ORFs que, provavelmente, codificam o complexo helicase-primase, o que pode estar relacionado com a propagação e desenvolvimento do vírus *in vitro*.

A ausência de uma cultura de células permissiva tem limitado o estudo de OvHV-2, sendo que a busca de um sistema desse tipo continua sendo uma prioridade.

7. CONCLUSÃO

1. Dos protocolos testados para extração de material *in natura*, o mais eficiente foi o Trizol[®], o qual se obteve maior intensidade de banda e o único em que se alcançou repetibilidade e reprodutibilidade.
2. Dos cinco kits testados para extração de material parafinado e dois protocolos recomendados pela literatura, o mais eficiente foi o que utilizou o xilol aquecido a 65°C para a remoção da parafina, digestão enzimática com o detergente SDS combinado com a proteinase K, purificação por fenol/clorofórmio e precipitação em isopropanol, no entanto não apresentou repetibilidade.
3. Foi possível padronizar e validar a PCR qualitativa para o OvHV-2, sendo que eliminou-se a segunda amplificação, com sensibilidade analítica de 10¹ cópias de DNA/μL.
4. Foi possível padronizar e validar a qPCR sistema SYBR[®]Green e TaqMan[®], com sensibilidade analítica de 10⁰ cópias de DNA/μL em ambos.
5. Das amostras analisadas *in natura* obteve-se 4,8% (14/290) de positividade na PCR qualitativa e 5,86% (17/290) na qPCR, a discordância da porcentagem de positividade possivelmente é devido a diferença de sensibilidade entre as técnicas.
6. Quando confrontados os resultados dos métodos moleculares de diagnóstico e histopatológico, houve discordância entre as porcentagens de positividade, pois na grande maioria das vezes a *rete mirabile* carotídea não é coletada e enviada para análise histopatológica, evidenciando a necessidade de treinamento dos veterinários em técnicas de colheita e envio de amostras de SNC bovino. Sendo assim, faz-se necessária a padronização de métodos mais específicos e sensíveis para diagnóstico da FCM, de extrema importância para a vigilância epidemiológica, uma vez que os casos suspeitos requerem um diagnóstico rápido e preciso.
7. O uso dos métodos moleculares de diagnóstico (PCR qualitativa e qPCR) direcionado ao ORF75 demonstrou ser viável e uma alternativa mais rápida para o diagnóstico tanto *ante-mortem* como *post-mortem* da FCM. Portanto, estas técnicas

podem e devem ser usadas, em conjunto, como ferramentas para o diagnóstico *ante-mortem* e *post-mortem* e na vigilância epidemiológica desta doença.

8. As amostras positivas foram sequenciadas, confirmando o diagnóstico clínico-epidemiológico, sendo que o OvHV-2 circulante no Brasil é, possivelmente, semelhante aos circulantes do mundo.
9. Foram sem sucesso as tentativas de isolamento em cultura de células MDBK das amostras positivas para OvHV-2 pela PCR e histopatológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABNEH, M. M.; HANANE, W. M.; DALAB, A. E. S. Molecular and Histopathological Characterization of Sheep-Associated Malignant Catarrhal Fever (SA-MCF) Outbreak in beef Cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 61, p. 75-80, 2012.
- BAPTISTA, F. Q.; GUIDI P. C. Febre catarral maligna no estado do Paraná. **A Hora Veterinária**, v. 45, p. 33-37, 1998.
- BARKER, I. K.; VAN DREUMEL, A. A.; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993.
- BARNARD, B. J .H.; VAN DER LUGT, J. J.; MUSHI, E. Z; COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. Infectious diseases of Livestock. **Oxford University Press**, v. 2., n. 107, p. 946-957, 1994.
- BARROS, C. S. L.; MARQUES, G. H. F. Procedimentos para o diagnóstico de doenças do sistema nervoso central de bovinos. Brasília: MAPA/SDA/DDA, 2003. 50 p.
- BARROS, S. S.; SANTOS, M. N.; BARROS, C. S. L. Surto de febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 3, p. 81-86, 1983.
- BASTAWECY, I. M.; EL-SAMEE, A. A. First Isolation and Identification of Ovine Herpesvirus 2 Causing Malignant Catarrhal Fever Outbreak in Egypt. **Life Science Journal**,v. 9, n. 3, p. 708-804, 2012.
- BAXTER, S. I. F.; POW, I.; BRIDGEN, A.; REID, H. W. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. **Archives of Virology**, v. 32, p. 145-159, 1993.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhoea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 1-10, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Programa Nacional de Controle da Raiva e outras Encefalopatias - PNCRH**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 abr. 2014a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. **Instrução Normativa nº44, de 17 de setembro de 2013**. Disponível em <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal> Acesso em maio 2014b.

BRATANICH, A.; SANGUINETTI, H.; ZENOBI, C.; BALZANO, R.; DEBENEDETTI, R.; RIVOLTA, M.; ALBAREDA, D.; BLANCO VIERA, J.; VENZANO, A.; CAPELLINO, F.; FUNES, D.; ZACARIAS, S. First confirmed diagnosis of Sheep-associated Malignant Catarrhal Fever in Bison in Argentina. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.5, n. 1, p. 20-24, 2012.

CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 1998.

CHAN, P. K. S.; CHAN, D. P. C.; TO, K. F.; YU, M. Y.; CHEUNG, J. L. K.; CHENG, A. F. Evaluation of extraction methods from parafim wax embedded tissue for pcr amplification of human and viral DNA. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 401-403, 2001.

CHMIELEWICZ, B.; GOLTZ, M.; EHLERS, B. Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. **Virus Research**, v. 75, n. 1, p. 87-94, 2001.

COLLERY, P.; FOLEY, A. An outbreak of malignant catarrhal fever in cattle in the Republic of Ireland. **The Veterinary Record**, v. 139, n. 1, p. 16-17, 1996.

COSTA, C. H. C.; PIRES, A. R. Surto de febre catarral maligna em cervídeos (*Cervus unicolor*) no Rio de Janeiro, RJ. **Comunicação científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP**, n. 14, p. 13, 1990.

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

COULTER, L. J.; REID, H. W. Isolation and expression of three open reading frames from ovine herpesvirus-2. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 533-543, 2002.

CRAWFORD, T. B.; LI, H.; O'TOOLE, D. Diagnosis of Malignant Catarrhal Fever by PCR using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 111-116, 1999.

CUNHA, C. W.; TRAU, D. L. Detection of ovine herpesvirus 2 major capsid gene transcripts as an indicator of virus replication in shedding sheep and clinically affected animals. **Virus Research**, v. 2, p. 69-75, 2008.

DeMARTINI, J. C. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction surey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 406-411, 2000.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C. H. Ocorrência de coriza gangrenosa dos bovinos no município de Serra Negra do Norte, Rio Grande do Norte. **Arquivos do Instituto de Biologia Animal**, v. 2, p. 65-82, 1959.

- DONALD, L. T.; TAUS, N. S.; OAKS, J. L.; O'TOOLE, D.; RURANGIRWA, F. R.; BASZLER, T. V.; LI H. N. Validation of nonnested and Real-Time PCR for Diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever in clinical samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 405, 2007.
- DRIEMEIER, D.; BRITO, M. F.; TRAVERSO, S. D.; CATTANI, C.; CRUZ, C. E. F. Outbreak of malignant catarrhal fever in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 151, n. 9, p. 271-272, 2002.
- EHLERS, B., K.; BORCHERS, C.; GRUND, K.; FROLICH, H.; LUDWIG, H. J. BUHK. Detection of new DNA polymerase genes of known and potentially novel herpesviruses by PCR with degenerate and deoxyinosine-substituted primers. **Virus Genes**, v. 18, p. 211-220, 1999.
- FIGUEIREDO, L. J. C.; CASTELO BRANCO, M. B.; OLIVEIRA, A. C. Aspectos clínicos e epidemiológicos da FCM. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 16., 1990, Salvador. **Anais ...** Salvador: Associação Mundial de Buiatria, 1990. p. 666-671.
- FLORES N.; VALLE, F.; BOLIVAR, F.; MERINO, E. Recovery of DNA from agarose gels stained with methylene blue. **Biotechniques**, v. 25, n. 13, p. 203-205, 1992.
- FURLAN, F. H.; AMORIM, T. M.; JUSTO, R. V.; MENDES, E. R. S.; ZILIO, M. G.; COSTA, F. L.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Febre catarral maligna em bovinos no norte de Mato Grosso – Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 2, p. 1043, 2012.
- GARMATZ, S. L.; IRIGOYEN, L. F.; RECH, R. R., BROWN, C. C.; ZHANG, J.; BARROS, C. S. L. Febre catarral maligna em bovinos no Rio Grande do Sul: transmissão experimental para bovinos e caracterização do agente etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 93-106, 2004.
- GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J.; PATTEN, C. L. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. 4. ed. Washington: ASM Press, 2009.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.
- HART, J.; ACKERMANN, M.; JAYWARDANE, G.; RUSSELL, G.; HAIG, D. M.; REID, H.; STEWART, P. Complete sequence and analysis of the ovine herpesvirus 2 genome. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 28-39, 2007.

HEADLEY, S. A.; SOUSA, I. K. F.; MINERVINO, A. H. H.; BARROS, I. O.; BARRETO JUNIOR, R. A.; ALFIERI, A. F.; ORTOLANI, E. L.; ALFIERI, A. A. Molecular confirmation of ovine herpesvirus 2-induced malignant catarrhal fever lesions in cattle from Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1213-1218, 2012.

HEUSCHELE, W. P.; NIELSEN, N. O.; OOSTERHUIS, J. E.; CASTRO, A. E. Dexamethasone-induced recrudescence of malignant catarrhal fever and associated lymphosarcoma and granulomatous disease in a Formosan sika deer (*Cervus Nippon taiouanus*). **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 7, p. 1578-1583, 1985.

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

HUA, Y.; LI, H.; CRAWFORD, T. B. X. Quantitation of sheep-associated malignant catarrhal fever viral DNA by competitive polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 117-121, 1999.

HUI, R. K. H.; ZENG, F. Z.; CHAN, C. M. N.; YUE, K. Y.; PEIRIS, J. S. M.; LEUNG, F. C. C. Reverse Transcriptase PCR Diagnostic Assay for the Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1994-1999, 2004.

HÜSSY, D.; STÄUBER, N.; LEUTENEGGER, C. M.; RIEDER, S.; ACKERMANN, M. Quantitative fluorogenic PCR assay for measuring ovine herpesvirus 2 replication in sheep. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 1, p. 123, 2001.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY ON VIRUSES. 2013. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp?Version=2013>. Acesso em: 20 jan. 2014.

KLIEFORTH, R.; MAALOUF, G.; STALIS, I.; TERIO, K.; JANSSEN, D.; SCHRENZEL, M. Malignant catarrhal fever-like disease in Barbary red deer (*Cervus elaphus barbarus*) naturally infected with a virus resembling alcelaphine herpesvirus 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3381-3390, 2002.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The Real Time Polymerase Chain Reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0. Pennsylvania State University and Arizona State University, Tempe, 2000.

LEVY, C. S. **Identification and Characterization of Ovine Herpesvirus 2 microRNAs.** 2011.189 f. Tese (Doutorado em Philosophy) University of Edinburgh, Escócia. 2011.

LI, H.; KELLER, J.; KNOWLES, D. P.; CRAWFORD, T. B. Recognition of another member of the malignant catarrhal fever virus group: an endemic gammaherpesvirus in domestic goats. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 227-232, 2001.

LI, H.; GAILBREATH, K.; BENDER, L. C.; WEST, K.; KELLER, J.; CRAWFORD, T. B. Evidence of three new members of malignant catarrhal fever virus group in Muskox (*Ovibos moschatus*), Nubian ibex (*Capra nubiana*), and Gemsbok (*Oryx gazella*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 39, n. 4, p. 875-880, 2003.

LI, H.; GAILBREATH, K.; FLACH, E. J.; TAUS, N. S.; COOLEY, J.; KELLER, J.; RUSSELL G. C.; KNOWLES, D. P.; HAIG, D. M.; OAKS, J. L.; TRAU, D. L.; CRAWFORD, T. B. A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. **Journal Gene Virology**, v. 86, p.3021-3026, 2005.

LI, H.; GAILBREATH, K.; FLACH, E. J.; TAUS, N. S.; COOLEY, J.; KELLER, J.; RUSSELL, G. C.; KNOWLES, D. P.; HAIG, D. M.; OAKS, J. L.. A novel subgroup of rhadinoviruses in ruminants. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 3021-3026, 2005.

LIGGITT, H. D.; DeMARTINI, J. C.; McCHESNEY, A. E.; PIERSON, R. E.; STORZ, J. Experimental transmission of malignant catarrhal fever in cattle: gross and histopathologic changes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 8, p. 1249-1257, 1978.

LIGGITT, H. D.; DeMARTINI, J. C. The pathomorphology of malignant catarrhal fever. 2. Multisystemic epithelial lesions. **Veterinary Pathology**, v. 17, n. 1, p. 73-83, 1980.

LUCENA, R. B.; PIEREZAN, F.; KOMMERS, G.D.; IRIGOYEN, L.F.; FIGHERA, R. A.; BARROS, C. S.L. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 5, n. 30, p. 428-434, 2010.

LUVIZOTTO, M. C. R.; FERRARI, H. F.; CARDOSO, T. C. Malignant catarrhal fever-like lesions associated with ovine herpesvirus-2 infection in young calves (*Bos indicus*): a case report. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 1, p.178-185, 2010.

MACKAY, I. A., ARDEN, K. E., NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MARQUES, L. C.; ALESSI, A. C.; BECHARA, G. H.; THOMAZ, B. V.; GUERRA, L. MARQUES, J. A. Surto de FCM em bovinos no estado de SP. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 38, p. 719-729, 1986.

MUSHI, E. Z.; ROSSITER, P. B.; JESSET, D.; KARSTAD, L. Isolation and characterization of a herpesvirus from topi (*Damaliscus korrigum* Ogilby). **Journal of Comparative Pathology**, v. 91, p. 63-68, 1981.

NASCIMENTO, E. M.; SPINELLI, M. O.; RODIRGUES, C. J. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 3, p. 253-255, 2003.

NAGY, B.; BAN, Z.; BEKE, A.; NAGY, G. R.; LAZAR, L.; PAPP, C.; TOTH-PAL, E.; PAPP, Z. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. **Clinica Chimica Acta**, v. 368, n. 1-2, p. 131-137, 2006.

NAKAJIMA, Y.; MOMOTANI, E.; ISHIKAWA, Y.; MURAKAMI, T.; SHIMURA, N.; ONUMA, M. Phenotyping of lymphocyte subsets in the vascular and epithelial lesions of a cow with malignant catarrhal fever. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 33, p. 279-284, 1992.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH . **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Chapter 2.4.15.Malignant catarrhal fever. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.15_MCF.pdf>. Acesso em: set. 2013.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. **Event summary Bovine Spongiform Encephalopathy, Brazil**. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=15148&newlang=en> Acesso em: abril 2014a.

OIE. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH **Event summary Bovine Spongiform Encephalopathy, Brazil**. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=12682> Acesso em maio 2014b.

OLIVEIRA, A. C.; FIGUEIREDO, L. J. C.; RESENDE, A. M. Casos de febre catarral maligna ocorridos em Riachão de Jacuípe, Bahia. Descrição clínica e anatomopatológica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 16., 1978, Salvador. **Anais ...** Salvador: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1978. p.130.

O'TOOLE, D.; LI, H.; MILLER, D.; WILLIAMS, W. R.; CRAWFORD, T. B. Chronic and recovered cases of sheep-associated malignant catarrhal fever in cattle. **The Veterinary Record**, v. 140, n. 20, p. 519-524, 1997.

O'TOOLE, D.; LI, H. The Pathology of Malignant Catarrhal Fever, With an Emphasis on Ovine Herpesvirus 2. **Veterinary Pathology Online**, v. 51, n. 2, p. 437-452, 2014.

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.

PITUCO, E. M.; CUNHA, E. M. S.; LARA, M. C. C. S. H.; OKUDA, L. H.; DE STEFANO, E.; DEL FAVA, C.; MACRUZ, R.; MARTINS, A. M. C. F.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S.; CASTRO, A. F.; SHIMOZONO, O. S.; TROTTER, C. M.; GREGORY, I.; POMPEI, J. C. A.; MARTINI, M. Encefalites e encefalopatias dos bovinos: Sistematização do diagnóstico diferencial. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 11.; CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5., Salvador, 2003. **Resumos...** Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003. p. 46.

PITUCO, E. M.; DEL FAVA, C.; RIBEIRO, C. P.; MIYASHIRO, S. Ruminantes, equídeos e suídeos. In: PANAFTOSA/OPAS/OMS. (Orgs). **Manual veterinário de colheita e envio de amostras: manual técnico.** Cooperação Técnica MAPA/OPAS-PANAFTOSA para o fortalecimento dos programas de saúde animal do Brasil. 1ª. ed. v. 13. Rio de Janeiro: PANAFTOSA/OPAS/OMS, 2010. p. 35-143.

PLOWRIGHT, W. Malignant catarrhal fever virus. In: Dinter, Z.; Morein, B. (Eds.) **Virus Infections of Ruminants.** New York: Elsevier Science, 1960. p. 123-150.

PRELIASCO, M.; EASTON, M. C.; PAULLIER C.; RIVERSO, R.; MORAES, D. F. S. D.; GODOY, I.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L. Diagnóstico de febre catarral maligna em bovinos do Uruguai. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 52-56, 2013.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Métodos Histotecnológicos.** Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América y Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, 1995. 280 p.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.** 9. ed. London: W. B. Saunders Company, 2000.

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

REID, H. W.; BRIDGEN, A. Recovery of a herpesvirus from a roan antelope (*Hippotragus equinus*). **Veterinary Microbiology**, v. 28, p. 269-278, 1991.

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.; MÉNDEZ, M. C.; SCHILD, A. L.; BROD, C. S.; BONDAN, E. F. Laboratório Regional de Diagnóstico. Doenças diagnosticadas no ano de 1987. Pelotas: Editora Gráfica Universitária, UFPel, 1988. p.15-16.

RUSSEL, G. C.; STEWART, J. P.; HAIG, D. M. Malignant catarrhal fever: A review. **The Veterinary Journal**, v. 179, p. 324-335, 2009.

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

SAMPAIO, F. A.; SAMPAIO, A. A.; DACORSO FILHO, P. Surto de febre catarral maligna em Campos, RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 13., 1972, Brasília, DF. **Anais ...** Brasília: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1972. p. 275.

SANCHES, A. W. D.; LANGOHR, I. M.; STIGGER, A. L.; BARROS, C. S. L. Doenças do sistema nervoso central em bovinos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n. 3, p.113-118, 2001.

SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina **Jornal Brasileiro de Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 541-548, 2011.

SILVA, S. M. M. S.; CAVALCANTE, H. S.; VIANA, G. E. N.; BARBOSA, A. A.; SILVA, S. A. V. Surto de febre catarral maligna. In: Encontro Nacional de Patologia Veterinária, 10., 2001, Pirassununga. **Anais ...** Jaboticabal: Funep, 2001. p. 70.

SIMON, S.; LI, H.; O'TOOLE, D.; CRAWFORD, T. B.; OAKS, J. L. The vascular lesions of a cow and bison with sheep-associated malignant catarrhal fever contain ovine herpesvirus 2-infected CD8(+) T lymphocytes. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 8, p. 2009-13, 2003.

SMITH, B. P. Malignant catarrhal fever. In: Ibid. (ed.) **Large Animal Internal Medicine**. St. Louis: Mosby, 2002. p. 714-716.

SOUSA, I. K. F.; BARROS, I. O.; CÂMARA, A.; MINERVINO, A. H. H.; BATISTA, J. S.; RAIMUNDO JR, A. B.; ORTOLANI, E. L. Surto de febre catarral maligna em bovinos no estado do Rio Grande do Norte. In: CONGRESSO MUNDIAL DE BUIATRIA, 8, 2009, Salvador. **Anais ...** Curitiba: Associação Brasileiro de Buiatria, 2009. p. 626.

TAUS, N. S.; TRAU, D. L.; OAKS, J. L.; CRAWFORD, T. B.; LEWIS, G. S.; LI, H. Experimental infection of sheep with ovine herpesvirus 2 via aerosolization of nasal secretions. **Journal of General Virology**, v. 86. p. 575-579, 2005.

THAM, K. M. Molecular and clinicopathological diagnosis of malignant catarrhal fever in cattle, deer and buffalo in New Zealand. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 12, p. 303-306, 1997.

TORRES, S. Oca, mal do chifre ou coryza gangrenosa dos bovinos. **Boletim da Sociedade Brasileira Medicina Veterinária**, v. 1, p. 144-159, 1924.

TRAUL, D. L.; TAUS, N. S.; OAKS, J. L.; O'TOOLE, D.; RURANGIRWA, F. R.; BASZLER, V.; LI, H. Validation of Nonnested and Real-time PCR for diagnosis of Sheep-associated Malignant Catarrhal fever. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 405-408, 2007.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. D. **Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses**. 7th Report. San Diego: Academic Press, 2000.


VIEIRA D. P. **Tutorial: Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações** (Protozoologia-IMTSP/ Laboratório de Biologia Molecular-IPEN) 2008. Disponível em <http://www.etall.hpg.com.br>. Acesso em: set. 2013.

WALKER, J. M.; RAPLEY, R. *Molecular Biology and Biotechnology*. 5. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009.

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 Certificado do comitê ética frente



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 59/08** sobre o Projeto: **“Diagnóstico laboratorial de enfermidades provocadas pelo Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) 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, renovado em 28 de julho de 2010 e 22 de agosto de 2012.

São Paulo, 22 de agosto de 2012.


Ricardo Spacagna Jordão
 Coordenador da CETEA-IB

Anexo 2 Certificado do comitê de ética verso

CETEA - IB

Registro

Número : 59/08

Livro : 01

Folha : 59

Data: 22/08/12

Anexo 3 Identidade entre as 13 amostras sequenciadas, baseada nas sequências de aminoácidos do ORF75

	10	20	30	40	50	60	70
6414-13/Restinga-São Paulo						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
364-12/Socorro- São Paulo						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
G251-09 Lagoa'douros-Pernambuco						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
1398-09/Martinópolis-São Paulo						
T.....AA.....G.....						
	MetValLeuProCysTrpValGlyGlnIleProGlyThrLeuLeuGlnGlyGlyArgAr						
G86-09/NI-Pernambuco						
	..A.....						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
798-07/Assis-São Paulo						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
20428-13/Bujari-Acre						
T.....AA.....						
	MetValLeuProCysTrpValGlyGlnIleProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
7983-13/Itirapuã-São Paulo						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
G355-09/NI-Pernambuco						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
24221-12/Ribeirão Preto-São Pa						
G.....						
	MetValLeuProCysTrpGlyGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
8012-13/Morungaba-São Paulo						
G.....						
	MetValLeuProCysTrpValGlyAspValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
8013-13/Itaguaçu- Espírito San						
	...T.....						
	MetValLeuProCysTrpValGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
25605-13/Silva Jardim-Rio de J						
	...AT.....G.....C.....						
	MetValLeuProCysTrpGlyGlyHisValProGlyThrLeuLeuGlnCysGlyArgAr						
	110	120	130	140	150	160	170
6414-13/Restinga-São Paulo						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
364-12/Socorro- São Paulo						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
G251-09 Lagoa'douros-Pernambuco						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
1398-09/Martinópolis-São Paulo						
G.....						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnGluProLeu						
G86-09/NI-Pernambuco						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
798-07/Assis-São Paulo						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
20428-13/Bujari-Acre						
G.....						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnGluProLeu						
7983-13/Itirapuã-São Paulo						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
G355-09/NI-Pernambuco						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
24221-12/Ribeirão Preto-São Pa						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
8012-13/Morungaba-São Paulo						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
8013-13/Itaguaçu- Espírito San						
	SerLeuLeuLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuArgSerProLeuProGlnLysProLeu						
25605-13/Silva Jardim-Rio de J						
	...S.....S.....						
	SerLeuXXXLeuProArgSerValGlnAspProArgSerLeuXXXSerProLeuProGlnLysProLeu						
	210	220	230	240	250	260	270
6414-13/Restinga-São Paulo						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaP						
364-12/Socorro- São Paulo						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaP						
G251-09 Lagoa'douros-Pernambuco						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaP						
1398-09/Martinópolis-São Paulo						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaP						
G86-09/NI-Pernambuco						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaP						
798-07/Assis-São Paulo						
S.....						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysXXXLeuProLeuSerValAlaAlaP						
20428-13/Bujari-Acre						
	EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaP						
7983-13/Itirapuã-São Paulo						
C.....T.....						


Anexo 3 Continuação

```

G355-09/NI-Pernanbuco      EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValProSerF
.....
24221-12/Ribeirão Preto-São Pa EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaF
.....
8012-13/Morungaba-São Paulo EndEndArgAlaAlaProSerPheAlaValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerValAlaAlaF
.....S.....A.....G....T.C.
EndEndArgXXXAlaProSerPheThrValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerGlyAlaSerF
.....
8013-13/Itaguaçu- Espírito San .....A.....G.C....G.
EndEndArgAlaAlaProSerPheThrValEndProEndProCysLeuLeuProLeuSerGlyProAlaF
.....S.....A.....S.....S.....S.....G.C..T.C.
25605-13/Silva Jardim-Rio de J EndEndArgXXXAlaProSerPheThrValXXXProXXXProXXXLeuXXXProLeuSerGlyProSerF
.....

```

Anexo 4 Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica (FORM SN)

 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA Departamento de Saúde Animal – DSA		TRIAGEM: ____/____/____ ENTRADA: ____/____/____ LAB: _____	
		1. Identificação do formulário (utilizar apenas uma opção) a) SVO: N° do FORM IN: <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> b) Outros: N° sequencial: <input type="text"/> - <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> FORM: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, N°: _____ Ano: <input type="text"/> UF: <input type="text"/>	
FORM SN Formulário Único de Requisição de Exames para Síndrome Neurológica			
A – Identificação do responsável pela colheita da(s) amostra(s)			
1. Nome		2. Registro profissional	3. CPF
<input type="text"/>		<input type="text"/>	<input type="text"/>
4. Endereço		5. Município	6. UF
<input type="text"/>		<input type="text"/>	<input type="text"/>
7. Telefone Fixo	8. Celular	9. FAX	10. E-mail
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
B – Identificação do responsável pela remessa da(s) amostra(s)			
1. Nome		2. Registro profissional	3. CPF
<input type="text"/>		<input type="text"/>	<input type="text"/>
4. Endereço		5. Município	6. UF
<input type="text"/>		<input type="text"/>	<input type="text"/>
7. Telefone Fixo	8. Celular	9. FAX	10. E-mail
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
C – Informações sobre o estabelecimento			
1. Nome	2. Município de localização	3. Código IBGE	4. UF
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
5. Proprietário		6. Produtor	
<input type="text"/>		<input type="text"/>	
7. Telefone Fixo	8. Celular	9. FAX	10. E-mail
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Datum utilizado	Formato Sexagesimal (Graus, Minutos e Segundos)	Formato Grau decimal	Quadrante estadual
Coordenadas geográficas → <input type="checkbox"/> SAD 69 Latitude: <input type="text"/> ° <input type="text"/> ' <input type="text"/> " <input type="checkbox"/> SIRGAS 2000 Longitude: <input type="text"/> ° <input type="text"/> ' <input type="text"/> " <input type="checkbox"/> WGS 84	<input type="checkbox"/> Norte ou <input type="checkbox"/> Sul H V <input type="text"/> <input type="text"/>		
D – Descrição do animal suspeito e do rebanho em que se encontra			
1. Espécie: <input type="checkbox"/> Bovina <input type="checkbox"/> Bubalina <input type="checkbox"/> Equídea <input type="checkbox"/> Ovína <input type="checkbox"/> Caprina <input type="checkbox"/> Suína <input type="checkbox"/> Canina <input type="checkbox"/> Felina <input type="checkbox"/> Morcego hematófago <input type="checkbox"/> Morcego não-hematófago <input type="checkbox"/> Animal silvestre			
2. Indicar país de origem para bovino ou bubalino importado: _____		3. Espécie do animal silvestre: _____	
4. Para ruminantes, indicar local onde a amostra foi colhida: <input type="checkbox"/> Estabelecimento de criação <input type="checkbox"/> Hospital veterinário <input type="checkbox"/> Aglomerações <input type="checkbox"/> Outros: _____			
5. Identificação do animal: <input type="text"/>	Idade: <input type="text"/> <input type="checkbox"/> Anos <input type="checkbox"/> Meses	Raça: _____	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
6. Método para estipular idade (ruminantes): <input type="checkbox"/> Registro genealógico <input type="checkbox"/> Cronologia dentária ou corneal <input type="checkbox"/> Marcação da vacina contra brucelose <input type="checkbox"/> Informado pelo responsável no Estabelecimento			
7. No caso de ruminante, avaliar se ingeriu ração em alguma fase da vida: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, quando: _____ <input type="checkbox"/> Sem informação			
8. N° de animais → No rebanho: <input type="text"/>	Doentes: <input type="text"/>	Mortos: <input type="text"/>	9. Havia outras espécies afetadas? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim, quais: _____
10. O animal morto já foi vacinado para (quando): <input type="checkbox"/> Raiva <input type="checkbox"/> Clostridiose <input type="checkbox"/> Sinomose <input type="checkbox"/> Leptospirose <input type="checkbox"/> Botulismo <input type="checkbox"/> Encefalomielite equina <input type="checkbox"/> Outra: _____			
E – Ações na propriedade suspeita e os sinais clínicos apresentados			
1. Origem da notificação: <input type="checkbox"/> Propriedade <input type="checkbox"/> Terceiros <input type="checkbox"/> Vigilância pelo SVO	2. Data (dd/mm/aaaa): Notificação → _____	1ª visita → _____	Provável início da doença → _____
3. No caso de ruminante, categoria do animal submetido à vigilância (marcar apenas uma opção):			
<input type="checkbox"/> 3.1. Com sinais clínicos de doença nervosa, por mais 15 dias (marcar uma das opções do item 4)	<input type="checkbox"/> 3.2. Com doença crônica, caquetizante ou depauperante, por mais de 15 dias	<input type="checkbox"/> 3.3. Em decúbito ou que não se locomove sem ajuda	<input type="checkbox"/> 3.4. Encontrado morto na fazenda ou transporte
<input type="checkbox"/> 3.5. Não aplicável para amostras de campo	<input type="checkbox"/> 3.6. Bovino ou bubalino importado de país de risco para EEB	<input type="checkbox"/> 3.7. Com vínculo epidemiológico de investigação de EET	
4. Tipos de sinais clínicos apresentados (aplicável apenas para categoria 3.1, e assinalar pelo menos uma opção de sinais):			
<input type="checkbox"/> Morte súbita	<input type="checkbox"/> Movimentos de pedagem	<input type="checkbox"/> Nistagmo	<input type="checkbox"/> Paralisia flácida membros posteriores
<input type="checkbox"/> Depressão	<input type="checkbox"/> Paralisia, mas alerta	<input type="checkbox"/> Tenesmo	<input type="checkbox"/> Paralisia flácida membros anteriores
<input type="checkbox"/> Ataxia	<input type="checkbox"/> Espasmos musculares	<input type="checkbox"/> Incoordenação	<input type="checkbox"/> Alteração comportamental
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Fotofobia/aerofobia
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Priaprismo
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Tremores
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Opistótono
5. Duração dos sinais clínicos: _____ horas <input type="checkbox"/> Sem informação (SI)	6. Eutanasiado? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim		
7. Havia animais que se recuperaram dos sinais clínicos? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> SI → Percentual: _____			
8. Houve contato direto de pessoas com animais suspeitos? <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> SI			
F – Informações sobre a colheita, acondicionamento e conservação da amostra			
1. Tipo de amostra enviada: <input type="checkbox"/> Encéfalo <input type="checkbox"/> Medula <input type="checkbox"/> Visceras <input type="checkbox"/> Outras: → Especificar: _____			
2. Data (dd/mm/aaaa) e hora (hh:mm) provável da morte: _____ às _____ horas		3. Data (dd/mm/aaaa) e hora (hh:mm) da colheita da(s) amostra(s): _____ às _____ horas	
4. Tempo entre a colheita e a conservação do material: _____ horas			
5. Meio de conservação: <input type="checkbox"/> Refrigerado <input type="checkbox"/> Formolizado <input type="checkbox"/> Congelado <input type="checkbox"/> Glicerina a 50% tamponada (exclusivamente para parte anatômica a ser submetida ao teste de raiva)			
G – Observações			
H – Responsável pela colheita			I – Para uso exclusivo do laboratório ou do SVO
Local: _____			1. Identificação da amostra no laboratório: <input type="text"/>
Data (dd/mm/aaaa): _____			2. No caso de ruminante submetido a teste de raiva, informar resultado para imunofluorescência direta → <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Positivo
Carimbo e assinatura			

Sequence Identity Matrix

Input Alignment File: Untitled

Anexo 5 Matriz de identidade das seqüências referência GenBank e as 13 amostras seqüenciadas neste estudo

Seq->	Genoma Completo/EUA-2007	BJ1035/Ucrania-1993	Bisão/Índia-2012	Cabra/Alemaha-2007	Bovino/Índia-2012	Bezerra/Paraná-2012	Cabra/Alemaha-2006	Bovino/RN-2008	Sambar/Alemanha-2006	Alece/Alemanha-2007	Bisão/Alemanha-2008	Bovino/África do Sul-2005	Bovino/África do Sul-2004	6414-13	364-12	G251-09	1398-09	G86-09	798-07	20428-13	7983-13	G355-09	24221-12	8012-13	8013-13	25605-13
Genoma Completo/EUA-2007	ID	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
BJ1035/Ucrania-1993	0,992	ID	1,000	0,996	0,992	0,989	0,992	0,992	0,992	0,992	0,989	0,992	0,989	0,992	0,992	0,992	0,989	0,989	0,989	0,992	0,981	0,992	0,989	0,967	0,960	0,916
Bisão/Índia-2012	0,992	1,000	ID	0,996	0,992	0,989	0,992	0,992	0,992	0,992	0,989	0,992	0,989	0,992	0,992	0,992	0,989	0,989	0,989	0,992	0,981	0,992	0,989	0,967	0,960	0,916
Cabra/Alemaha-2007	0,989	0,996	0,996	ID	0,989	0,985	0,989	0,989	0,989	0,989	0,985	0,989	0,985	0,989	0,989	0,989	0,985	0,985	0,985	0,989	0,978	0,989	0,985	0,963	0,956	0,913
Bovino/Índia-2012	0,985	0,992	0,992	0,989	ID	0,981	0,985	0,985	0,985	0,985	0,981	0,985	0,981	0,985	0,985	0,985	0,981	0,981	0,981	0,985	0,974	0,985	0,981	0,960	0,953	0,909
Bezerra/Paraná-2012	0,996	0,989	0,989	0,985	0,981	ID	0,996	0,996	0,996	0,996	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,978	0,992	0,992	0,981	0,985	0,996	0,992	0,971	0,963	0,920
Cabra/Alemanha-2006	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	ID	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
Bovino/Rio Grande do Norte-2008	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	ID	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
Sambar/Alemanha-2006	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	ID	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
Alece/Alemanha-2007	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	ID	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
Bisão/Alemanha-2008	0,996	0,989	0,989	0,985	0,981	0,992	0,996	0,996	0,996	0,996	ID	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,978	0,992	0,992	0,981	0,985	0,996	0,992	0,971	0,963	0,920
Bovino/África do Sul-2005	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	ID	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
Bovino/África do Sul-2004	0,996	0,989	0,989	0,985	0,981	0,992	0,996	0,996	0,996	0,996	0,992	0,996	ID	0,996	0,996	0,996	0,978	0,992	0,992	0,981	0,985	0,996	0,992	0,971	0,963	0,920
6414-13/Restinga-São Paulo	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	ID	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
364-12/Socorro- São Paulo	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	ID	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
G251-09	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	ID	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	1,000	0,996	0,974	0,967	0,924
1398-09	0,981	0,989	0,989	0,985	0,981	0,978	0,981	0,981	0,981	0,981	0,978	0,981	0,978	0,981	0,981	0,981	ID	0,978	0,978	0,996	0,971	0,981	0,978	0,956	0,949	0,906
G86-09	0,996	0,989	0,989	0,985	0,981	0,992	0,996	0,996	0,996	0,996	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,978	ID	0,992	0,981	0,985	0,996	0,992	0,971	0,963	0,920
798-07	0,996	0,989	0,989	0,985	0,981	0,992	0,996	0,996	0,996	0,996	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,978	0,992	ID	0,981	0,985	0,996	0,992	0,971	0,963	0,920
20428-13	0,985	0,992	0,992	0,989	0,985	0,981	0,985	0,985	0,985	0,985	0,981	0,985	0,981	0,985	0,985	0,985	0,996	0,981	0,981	ID	0,974	0,985	0,981	0,960	0,953	0,909
7983-13	0,989	0,981	0,981	0,978	0,974	0,985	0,989	0,989	0,989	0,989	0,985	0,989	0,985	0,989	0,989	0,989	0,971	0,985	0,985	0,974	ID	0,989	0,985	0,971	0,963	0,927
G355-09	1,000	0,992	0,992	0,989	0,985	0,996	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,981	0,996	0,996	0,985	0,989	ID	0,996	0,974	0,967	0,924
24221-12	0,996	0,989	0,989	0,985	0,981	0,992	0,996	0,996	0,996	0,996	0,992	0,996	0,992	0,996	0,996	0,996	0,978	0,992	0,992	0,981	0,985	0,996	ID	0,971	0,963	0,927
8012-13	0,974	0,967	0,967	0,963	0,960	0,971	0,974	0,974	0,974	0,974	0,971	0,974	0,971	0,974	0,974	0,974	0,956	0,971	0,971	0,960	0,971	0,974	0,971	ID	0,967	0,935
8013-13	0,967	0,960	0,960	0,956	0,953	0,963	0,967	0,967	0,967	0,967	0,963	0,967	0,963	0,967	0,967	0,967	0,949	0,963	0,963	0,953	0,963	0,967	0,963	0,967	ID	0,924
25605-13	0,924	0,916	0,916	0,913	0,909	0,920	0,924	0,924	0,924	0,924	0,920	0,924	0,920	0,924	0,924	0,924	0,906	0,920	0,920	0,909	0,927	0,924	0,927	0,935	0,924	ID



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ