

INSTITUTO BIOLÓGICO

PÓS-GRADUAÇÃO

**ANÁLISE DA EFICIÊNCIA E DO CUSTO-BENEFÍCIO
DA RT-PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO
DA DIARREIA VIRAL BOVINA**

ANA LUIZA RAMOS DE OLIVEIRA

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: Prof^a. Dr^a. Edviges Maristela Pituco

**São Paulo
2013**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Oliveira, Ana Luiza Ramos de.

Análise da eficiência e do custo-benefício da RT-PCR em tempo real no diagnóstico da diarreia viral bovina. / Ana Luiza Ramos de Oliveira. -- São Paulo, 2013.

115 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

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

Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na Produção Animal.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Analysis of efficiency and cost-benefit of real time RT-PCR in the diagnosis of bovine viral diarrhea.

1. Soro fetal bovino 2. Kits diagnósticos 3. *Pestivirus* 4. Custo-benefício
I. Oliveira, Ana Luiza Ramos de II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2013/005



**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

Ana Luiza Ramos de Oliveira

Título: ANÁLISE DA EFICIÊNCIA E DO CUSTO-BENEFÍCIO DA RT-PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA DIARREIA VIRAL BOVINA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. 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:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a):

Instituição:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Leonardo, pois durante esses dois anos de mestrado nós nos reencontramos, fomos namorados, noivos e agora somos casados. Obrigado por tudo o que você é para mim e por ter sido a maior motivação para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTO

À minha orientadora, Dr^a Edviges Maristela Pituco, que primeiro me deu a oportunidade de realizar esse trabalho, me acolheu no laboratório de Víruses de Bovídeos do Instituto Biológico e que, além disso, sempre esteve à disposição para o que fosse preciso, me ajudando e orientando literalmente.

À Liria Okuda, Eliana Stefano, Adriana Nogueira e Claudia Pestana, pela ajuda que nunca me negaram, e pelos ensinamentos que sempre tem a passar.

À Claudia Del Fava, por estar sempre à disposição para esclarecer as dúvidas, sugerir ideias e corrigir o trabalho.

Aos colegas e funcionários do LVB, Michele, Thaís, Maira, Adriana, Simone, Vivian, Márcia, Marta, Randy, Raquel, Washigton, pela companhia e convivência diária, também porque, de alguma maneira, estiveram envolvidos em pelo menos uma etapa do processamento das amostras desse trabalho, e por ajudarem sempre que preciso.

À Simone Miyashiro, que esteve desde o início do trabalho ao meu lado, com toda paciência para me ensinar tudo o que era novo para mim, além de ter me ajudado a passar pelos obstáculos que foram surgindo e sugerir sempre boas ideias.

Ao Ricardo Harakava, que me ajudou com a confecção dos clones e controles de RNA e deu grandes dicas para o aperfeiçoamento do trabalho em relação à biologia molecular.

Ao Augusto Gameiro, professor membro da banca examinadora, que muito me ajudou com a análise custo-benefício das técnicas diagnósticas, me orientando e auxiliando no desenvolver do trabalho.

Ao Enio Mori, pesquisador, também membro da banca examinadora, que me deu muitas dicas e ótimas sugestões com a correção desse trabalho.

Ao meu marido, Leonardo, que me consolou todas as vezes que eu tive medo, achando que não daria tempo, e que, além disso, me ajudou com a tabulação e análise de todos os dados do custo-benefício do trabalho.

Aos meus pais, Luiz Eduardo e Marina, que me incentivaram e ajudaram a mais uma vez concluir uma etapa de estudo na minha vida. E ao meu pai, que contribuiu com sua experiência para que eu conseguisse entender e pôr em prática toda a parte econômica do trabalho.

Ao Instituto Biológico de São Paulo e à todos os professores da Pós-Graduação que contribuíram para a minha formação como mestre.

A CAPES, pelo apoio com a bolsa de auxílio.

O meu muito obrigado! Sem vocês por perto, esse trabalho não seria o mesmo e esses dois anos não teriam sido especiais.

EPÍGRAFE

“Uma das mais cativantes ironias do pensamento moderno é o fato de que o método científico, do qual ingenuamente se esperou no passado que pudesse banir o mistério do mundo, deixa-o cada dia mais inexplicável.”

CARL BECKER (1932)

“Na verdade só sabemos quão pouco sabemos – com o saber cresce a dúvida”

GOETHE (1826)

RESUMO

OLIVEIRA, A.L.R. - ANÁLISE DA EFICIÊNCIA E DO CUSTO-BENEFÍCIO DA RT-PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA DIARREIA VIRAL BOVINA. São Paulo, 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

O Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Pestivirus*, está disseminado pelo mundo e ocasiona perdas econômicas para os rebanhos de produção. Os ensaios imunoenzimáticos para captura de antígeno (ELISA_{Ag}) e a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) têm sido utilizados no diagnóstico do BVDV. Outra opção disponível é a RT-PCR em tempo real (qRT-PCR), que possui as mesmas vantagens da reação convencional - uma técnica bastante sensível e específica, capaz de detectar pequenas concentrações de vírus, mesmo os não viáveis -, mas que, além disso, permite a mecanização do processo e leitura do resultado através de fluorescência, conjunto esse que o torna mais ágil e de maior confiança. Objetivou-se: (I) Validar a qRT-PCR para o diagnóstico do BVDV, (II) avaliar a relação custo-benefício da qRT-PCR, em comparação a RT-PCR convencional, (III) comparar os resultados de amostras teste analisadas pela RT-PCR convencional, qRT-PCR, ELISA_{Ag}. Foram analisados pelos três métodos citados acima, 172 lotes de soro fetal bovino (SFB), recebidos pelo Laboratório de Vírus de Bovídeos do Instituto Biológico de São Paulo, no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2012. A sensibilidade analítica da RT-PCR convencional ficou em 10^1 TCID₅₀/50 μ L para BVDV-1 e 10^0 TCID₅₀/50 μ L para BVDV-2, enquanto que a validação da qRT-PCR revelou que o teste detecta até 10^1 cópias de RNA/ μ L. Quando comparado os resultados das amostras de SFB naturalmente contaminados, detectou-se, pelo teste ELISA_{Ag}, 19,19% (33/172) de positivas para o BVDV, na RT-PCR convencional 70,34% (121/172) de positivas e na qRT-PCR 81,97% (141/172), o que demonstra um melhor desempenho aos métodos moleculares, provavelmente devido à interferência de anticorpos presentes nos lotes de SFB quando realizado o ELISA_{Ag} ou devido à incompatibilidade de reagentes utilizados na produção do Kit em relação às cepas virais locais. A análise custo-benefício revelou ser a qRT-PCR 25,5% mais econômica e também mais vantajosa do que a reação convencional.

Palavras-chave: Soro fetal bovino, kits diagnósticos, *pestivirus*, custo-benefício

ABSTRACT

OLIVEIRA, A.L.R. - ANALYSIS OF EFFICIENCY AND COST-BENEFIT OF REAL TIME RT-PCR IN THE DIAGNOSIS OF BOVINE VIRAL DIARRHEA. São Paulo, 2013. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

The bovine viral diarrhoea virus (BVDV) which belongs to *Flaviviridae* family and *Pestivirus* genus is worldwide spread and, because of this, causes economic losses to livestock production. The enzyme immunoassays for antigen capture (ELISA_{Ag}) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) have been used in the diagnosis of bovine BVDV. Another option available is the real time RT-PCR (qRT-PCR), which has the same advantages of conventional RT-PCR - a very sensitive and specific technique, that is able to detect low concentration of virus, even those not infectious -, but also allows the process mechanization and analysis results through fluorescence, and these both things make it faster, more trustable and highly sensitive and specific. This study aimed to: (I) validate the qRT-PCR for the diagnosis of BVDV, (II) measure the cost-benefit of qRT-PCR compared to conventional RT-PCR, (III) compare the results samples analyzed by conventional RT-PCR, qRT-PCR and ELISA_{Ag}. It was analyzed, by the three methods mentioned above, 172 batches of fetal bovine serum (FBS), received at the Bovine Viral Diseases Laboratory of Instituto Biológico of São Paulo, from January 2005 to December 2012. The analytical sensitivity of conventional RT-PCR was 10^1 TCID₅₀/50 μ L for BVDV-1 and 10^0 TCID₅₀/50 μ L for BVDV-2, while validation in qRT-PCR reveal that the test is able to detect until 10^1 copies of RNA/ μ L. Comparing the results of naturally contaminated FBS samples, it was detected, by ELISA_{Ag} test, 19.19% (33/172) of positive for BVDV, while in conventional RT-PCR 70.34% (121/172) and qRT-PCR 81.97% (141/172). These results indicate a better performance on molecular methods, probably due to interference of antibodies present in lots of FBS when ELISA_{Ag} test was done, or due to incompatibility of reagents used in production kit regarding local viral strains. The cost-benefit analysis revealed that qRT-PCR is 25.5% cheaper and brings more advantages than the conventional reaction.

Key-words: Fetal bovine serum, diagnostic kits, pestiviruses, cost-benefit

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ilustração esquemática de uma partícula da família *Flaviviridae* com os seus componentes (RIDPATH & FLORES, 2007) 25
- Figura 2 - Esquema do genoma do vírus da Diarreia Viral Bovina (<http://www.bvd-info.ch/images/stories/bvd/vet/genome.jpg>) 25
- Figura 3 - Arvore filogenética do gênero *pestivirus*, representando as espécies oficiais e as atípicas (“HoBi-like”, Giraffe, Pronghorn e Bungowannah), marcadas com uma bola ao lado do nome (BAUERMANN et al., 2013) 28
- Figura 4 - Esquema das etapas da reação em cadeia pela polimerase (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>)..... 37
- Figura 5 - Esquema da síntese de cópias de DNA, feitas através da PCR (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>)..... 38
- Figura 6 - Esquema da posição dos oligonucleotídeos iniciadores na região 5’UTR do genoma viral 52
- Figura 7 - Gel de eletroforese, com a reação de validação da RT-PCR convencional para BVDV-1. pb: DNA ladder de 100 pb (Invitrogen®); canaletas 4,8,12,19,23,27: Branco; canaletas 1-3: BVDV-1 10⁵ ; canaletas 5-7: BVDV-1 10⁴; canaletas 9-11: BVDV-1 10³; canaleta 13-15: BVDV-1 10²; canaletas 16-18: BVDV-1 10¹; canaletas 20-22: BVDV-1 10⁰; canaletas 24-26: BVDV-1 10⁻¹; canaletas 28-30: controle negativo (CN). 61
- Figura 8 - Gel de eletroforese, com a reação de validação da RT-PCR convencional para BVDV-2. pb: DNA ladder de 100 pb (Invitrogen®); canaletas 4,8,12,19,23,27: Branco; canaletas 1-3: BVDV-2 10⁵ ; canaletas 5-7: BVDV-2 10⁴; canaletas 9-11: BVDV-2 10³; canaleta 13-15: BVDV-2 10²; canaletas 16-18: BVDV-2 10¹; canaletas 20-22: BVDV-2 10⁰; canaletas 24-26: BVDV-2 10⁻¹; canaletas 28-30: controle negativo (CN). 62

- Figura 9 - Gel de eletroforese, com a reação de validação da RT-PCR convencional quando utilizado o RNA controle sintetizado in vitro. pb: DNA ladder de 100 pb (Invitrogen®); canaleta 1 a 12 – diluição seriada na base 10 do RNA controle, iniciando em 10^9 a 10^{-2} ; canaleta 13: controle negativo 62
- Figura 10 - Curva padrão com o RNA sintético diluído de 10^9 a 10^0 , controle positivo do Kit e controle negativo, controle positivo do Kit e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.00377; Eficiência = 1.879; Slope = -3.651 64
- Figura 11 - SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1. Diluições de 10^5 a 10^{-1} TCID₅₀/50µL, controle positivo do Kit com 10^4 cópias de RNA/µL e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.0433; Eficiência = 1.868; Slope = -3.686 65
- Figura 12 - SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1. Diluições de 10^5 a 10^{-2} TCID₅₀/50µL, controle positivo do Kit com 10^4 cópias de RNA/µL e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.169; Eficiência = 1.950; Slope = -3.449 66
- Figura 13 - SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-2. Diluições de 10^5 a 10^{-2} TCID₅₀/50µL, controle positivo do Kit com 10^4 cópias de RNA/µL e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.0147; Eficiência = 1.866; Slope = -3.690 67
- Figura 14 - Gel de eletroforese com diluições do RNA sintético, da reação de qRT-PCR. pb: DNA ladder de 20 pb (Invitrogen®), canaleta 1 a 10: diluição seriada na base 10, de 10^9 cópias de RNA/µL a 10^0 cópias de RNA/µL. 68
- Figura 15 - Gel de eletroforese com diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1, da reação de qRT-PCR com o kit VetMAX™. pb: DNA ladder de 20 pb (Invitrogen®), canaleta 1 a 10: diluição seriada na base 10, de 10^3 TCID₅₀/50µL a 10^{-2} TCID₅₀/50µL. 69
- Figura 16 - Gel de eletroforese com diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-2, da reação de qRT-PCR com o kit VetMAX™. pb: DNA ladder de 20 pb (Invitrogen®), canaleta 1 a 10: diluição seriada na base 10, de 10^3 TCID₅₀/50µL a 10^{-2} TCID₅₀/50µL. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos lotes de SFB testados pelos métodos de ELISA_{Ag} e RT-PCR convencional 74
- Tabela 2 - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos lotes de SFB testados pelos métodos de ELISA_{Ag} e qRT-PCR..... 74
- Tabela 3 - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos lotes de SFB testados pelos métodos RT-PCR convencional e qRT-PCR 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição de proteínas estruturais do vírus da Diarreia Viral Bovina.	26
Quadro 2 -	Descrição de proteínas não-estruturais do vírus da Diarreia Viral Bovina	26
Quadro 3 -	Estudos sorológicos da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina realizados no Brasil (1971-2004).....	31
Quadro 4 -	Diluição seriada do BVDV	48
Quadro 5 -	Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR convencional para BVDV	52
Quadro 6 -	Descrição do tamanho do produto do BVDV pela RT-PCR convencional	53
Quadro 7 -	Condições de amplificação da qRT-PCR	54
Quadro 8 -	Relação dos itens incluídos nos custos fixos e variáveis da análise custo-benefício.	57
Quadro 9 -	Itens somados para o cálculo do custo total médio por exame.....	60
Quadro 10 -	Média do Cp e da concentração das diluições do RNA controle	64
Quadro 11 -	Média do Cp e da concentração das diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1- 10^5 a 10^{-1} TCID ₅₀ /50 μ L.....	66
Quadro 12 -	Média do Cp e da concentração das diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1- 10^5 a 10^{-2} TCID ₅₀ /50 μ L.....	67
Quadro 13 -	Média do Cp e da concentração das diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-2 - 10^5 a 10^{-2} TCID ₅₀ /50 μ L.....	68

Quadro 14 - Separação de amostras positivas, pela qRT-PCR, em grupos, de acordo com a concentração de vírus. E0 – E5: amostras com concentração de vírus de 10^0 a 10^5	70
Quadro 15 - Valores de D.O. considerados positivos das amostras de SFB testadas pelo ELISA Ag	71
Quadro 16 - Amostras de SFB reagentes ao BVDV testadas na virusnetralização	73
Quadro 17 - Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice <i>kappa</i>	74
Quadro 18 - Cenário 1: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com a capacidade máxima de exames para cada técnica	76
Quadro 19 - Cenário 2: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com valores iguais para o custo total mensal	77
Quadro 20 - Cenário 3: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com valores iguais para o custo total médio final da amostra.....	78
Quadro 21 - Cenário 4: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com número igual de amostras por mês.....	79
Quadro 22 - Cenário 5: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com maior número de exames por mês pela RT-PCR convencional.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Lotes de SFB submetidos ao teste de RT-PCR convencional	63
Gráfico 2 -	Lotes de SFB submetidos ao teste de RT-PCR em tempo real	70
Gráfico 3 -	Porcentagem de amostras positivas pela qRT-PCR, separadas em grupos, de acordo com a concentração de vírus. E0 – E5: amostras com concentração de vírus de 10^0 a 10^5	71
Gráfico 4 -	Lotes de SFB submetidos ao teste de Elisa Antígeno	72
Gráfico 5 -	Lotes de SFB submetidos ao teste de Virusneutralização	73

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 -	Comissão de ética (frente).....	95
ANEXO 2 -	Comissão de ética (verso).....	96
ANEXO 3 -	Quadro com os dados individuais das amostras de SFB testadas por RT-PCR convencional, qRT-PCR, ELISA Ag e Virusneutralização do experimento	97
ANEXO 4 -	Sequência do BVDV-1, estirpe NADL, retirada do <i>GenBank</i> ®, alinhada com o vírus padrão NADL do LVB	104
ANEXO 5 -	Sequência de um isolado de BVDV-2 , do gene 5´UTR (KIM et al., 2009), retirada do <i>GenBank</i> ®, alinhada com o vírus padrão VS-253 do LVB.....	105
ANEXO 6 -	Tabulação dos custos envolvidos na RT-PCR convencional e qRT-PCR para detecção do BVDV-1 e 2.....	106
ANEXO 7 -	Tabulação dos custos referentes a depreciação e certificação de equipamento e materiais, envolvidos na RT-PCR convencional e qRT-PCR para detecção do BVDV-1 e 2.....	111

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

®	=	Marca Registrada
Ag	=	Antígeno
Ac	=	Anticorpo
Atb	=	Antibiótico
ATCC	=	<i>American Type Culture Collection</i>
BDV	=	Vírus da Doença das Fronteiras
BVD	=	Diarreia Viral Bovina – <i>Bovine Viral Diarrhea</i>
BVDV	=	Vírus da Diarreia Viral Bovina – <i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i>
CO ₂	=	Dióxido de carbono
CP	=	Citopatogênico
CSFV	=	Vírus da Peste Suína Clássica
Cp	=	Limiar de detecção da PCR em tempo real
°C	=	Grau Celsius
cDNA	=	Ácido desoxirribonucleico complementar
DEPC	=	Diethyl Pirocarbonato
DNA	=	Ácido desoxirribonucleico
DM	=	Doença das Mucosas
DO	=	Densidade Óptica
€	=	Euro
EUA	=	Estados Unidos da América
ECP	=	Efeito Citopático
E ^{rns}	=	Glicoproteína do envelope do vírus da BVD
ELISA	=	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	=	Gramma
h	=	Hora
H ₂ O	=	Água
IB	=	Instituto Biológico
ICTV	=	Comitê internacional de taxonomia de vírus
LVB	=	Laboratório de Víroses de Bovídeos
mL	=	Mililitro
µL	=	Microlitro
mM	=	Milimolar
µM	=	Micromolar
Min	=	Minuto

MDBK	=	<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>
MEM	=	Meio essencial mínimo - <i>minimal essential medium</i>
NCP	=	Não Citopatogênico
nm	=	Nanometros
OIE	=	Organização Mundial de Saúde Animal
ORF	=	<i>Open Reading Frame</i>
pb	=	Pares de base
PCR	=	Reação em cadeia pela polimerase
PI	=	Persistentemente Infectado
qPCR	=	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
qRT-PCR	=	RT – reação em cadeia pela polimerase quantitativa
R\$	=	Reais
RNA	=	Ácido Ribonucléico
RT	=	Transcrição reversa
RT-PCR	=	Transcrição reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase
SFB	=	Soro Fetal Bovino
TCID ₅₀	=	Dose infecciosa 50% para cultura de tecidos
TBE	=	TBE é constituído pela mistura do Tris / Borato /EDTA,
V	=	Voltagem
VN	=	Vírusneutralização
x g	=	Força Centrífuga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. HISTÓRICO	22
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO	24
2.3. GENOMA DO BVDV	25
2.4. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS	29
2.5. TRANSMISSÃO	29
2.6. EPIDEMIOLOGIA	30
2.7. PATOGENIA	32
2.8. SINAIS CLÍNICOS	33
2.9. ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI).....	34
2.10. DIAGNÓSTICO.....	35
2.10.1 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	37
2.11. TRATAMENTO	40
2.12. PREVENÇÃO E CONTROLE	41
2.13. PERDAS ECONÔMICAS	42
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. AMOSTRAGEM.....	46
4.2. PRODUÇÃO DE LOTES DE SFB.....	46
4.3. PADRÕES	47
4.3.1. VÍRUS PADRÃO	47
4.3.2. CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DE SORO FETAL BOVINO.....	47
4.3.3. CURVA PADRÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	48
4.3.4. SOROS CONTROLE	49
4.4. CULTURAS CELULARES	49
4.5. REPLICAÇÃO VIRAL	50
4.6. TITULAÇÃO VIRAL	50
4.7. DETECÇÃO DO BVDV	51
4.7.1. TESTES MOLECULARES	51
4.7.1.1. EXTRAÇÃO DO RNA	51
4.7.2. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) CONVENCIONAL – ONE STEP.....	51

4.7.2.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>)	52
4.7.2.2. RESULTADOS - ELETROFORESE	53
4.7.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	53
4.7.3.1. GARANTIA DA QUALIDADE DA REAÇÃO.....	54
4.7.4. ELISA ANTÍGENO	55
4.8. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-BVDV	55
4.8.1. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO	55
4.8.1.1. GARANTIA DA QUALIDADE DA REAÇÃO.....	56
4.9. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	57
4.10. ANÁLISE CUSTO-BENEFÍCIO DA RT-PCR (CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL)	57
4.10.1. CUSTO FIXO.....	58
4.10.2. CUSTO VARIÁVEL.....	59
4.10.3. CUSTO TOTAL MÉDIO FINAL	59
5. RESULTADOS	61
5.1. SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) CONVENCIONAL - ONE STEP	61
5.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS TESTE PELA RT-PCR CONVENCIONAL.....	63
5.3. VALIDAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR).....	63
5.4. SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)	65
5.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS TESTE PELA qRT-PCR.....	69
5.6. ELISA ANTÍGENO	71
5.7. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO	73
5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	73
5.9. ANÁLISE CUSTO-BENEFÍCIO	75
6. DISCUSSÃO	81
7. CONCLUSÃO.....	85
8. REFERÊNCIAS	86
9. ANEXOS	95

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Classificada como a segunda maior criação de gado bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, e desde 2004, líder nas exportações, o rebanho bovino brasileiro propicia o desenvolvimento da cadeia produtiva da carne e do leite, duas atividades presentes em todos os estados - tanto nas grandes como nas pequenas propriedades -, o que comprova sua importância econômica e social para o país.

A Diarreia Viral Bovina (BVD) é considerada uma importante barreira na produção pecuária por estar disseminada em todo o rebanho do mundo e por provocar perdas econômicas significativas. Ela é originada pelo vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), pertencente à família *Flaviviridae*, do gênero *Pestivirus*, e, além dos problemas gastrointestinais identificados nos primeiros casos de manifestação da doença – fato que, inclusive, deu nome à enfermidade –, ocasiona abortamentos, nascimento de bezerros fracos, além de complicações nos quadros respiratórios. Além disso, o vírus tem tropismo por células do sistema imune, o que causa uma imunossupressão dos animais infectados. Com tais alterações em seus organismos, os animais:

1. param de produzir o máximo que poderiam;
2. são mais facilmente acometidos por outros agentes e, por isso, podem apresentar doenças paralelas, o que gera gastos com medicamentos;
3. apresentam – no caso de fêmeas -, dificuldade para emprenhar e deixam de atingir a média almejada de um bezerro ao ano, o que diminui em quantidade a sua produção; ainda relacionado à essa questão, os produtores que fazem uso da inseminação artificial terão de dispor de maiores quantidades de sêmen;
4. promovem perdas econômicas indiretas, relacionadas à qualidade e à quantidade do leite produzido.

Uma importante característica da doença é a existência de animais persistentemente infectados (PI). Eles são gerados quando o vírus infecta fêmeas prenhes soronegativas, no período gestacional entre 40 e 120 dias, e, por conseguir atravessar as barreiras transplacentárias, o vírus instala-se também no feto cujo organismo, por não ter sua imunidade formada, identifica o antígeno como próprio e, assim, não produz anticorpos de proteção. Esses animais PI são disseminadores potenciais do vírus, pois, uma vez que não apresentam sinais clínicos evidentes da doença, estes não são detectados em provas diagnósticas indiretas, como a virusneutralização (VN) e o ELISA indireto, e passam despercebidos dentro de um rebanho.

Desse modo, um dos métodos de controle da doença é, justamente, a identificação dos animais PI, por meio de métodos diagnósticos diretos - tais como a RT-PCR (convencional e em tempo real), o ELISA antígeno e o isolamento viral - seguida de sua eliminação do rebanho. Como, muitas vezes ocorre uma demora no diagnóstico correto dessa doença, os animais PI ficam mais tempo em contato com os sadios e, conseqüentemente, mais tempo disseminando-a no rebanho, gerando fonte de gastos que comprovam novamente a importância econômica da BVD. Assim, faz-se necessário o aprimoramento de técnicas diagnósticas que possam aliar uma boa sensibilidade e especificidade diagnósticas e que, também, sejam rápidas e de confiança, como, por exemplo, a reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real, que utiliza uma sonda específica, quando usado o sistema Taqman, para detecção do fragmento alvo, sendo a leitura do resultado feita por captação da fluorescência.

Mas, antes da implementação da técnica, é pertinente que se analise – por meio de um estudo de rentabilidade econômica - a relação custo-benefício dessa nova técnica diagnóstica direta que, através da automação do processo diminui as porcentagens de erro e agiliza a entrega de resultados, quando em comparação com a RT-PCR convencional, VN e o isolamento viral. Além disso, um rebanho em que se identifica e elimina os animais PI pelo novo método proposto e, portanto, se previne a doença de maneira mais rápida, tem vantagens reais no controle e disseminação da doença em relação a rebanhos positivos e sem controle. Esse procedimento, se estendido ao rebanho nacional, demonstra o grande ganho econômico que o país pode ter se passar a utilizar a PCR em tempo real.

Quanto mais rápido o animal PI for identificado e eliminado, menores são as chances de eles continuarem a conviver com outros sadios, aumentando o prejuízo dos produtores, e as possibilidades de disseminação da doença. A técnica, sendo mais ágil, acelera também os processos que envolvem a exportação de produtos de origem animal, como sêmen e embriões.

Outro desafio no diagnóstico laboratorial é o fato do vírus da Diarreia Viral Bovina apresentar uma grande variabilidade antigênica. Isolados brasileiros revelaram a presença de pelo menos dois genótipos: o BVDV-1 e o BVDV-2. Devido a essa variabilidade antigênica, característica dos *Pestivirus*, há necessidade de vigilância sistemática sobre elas, capaz de auxiliar nas ações de controle da doença e, principalmente, para assegurar que as formulações das vacinas utilizadas no Brasil contenham estirpes representativas das que ocorrem no campo, garantindo-se, então, a proteção dos animais vacinados.

Portanto, é de grande importância a identificação e tipificação das estirpes virais através de provas moleculares mais sensíveis, precisas e exatas, tanto para a vigilância da doença quanto para selecionar e estudar essas estirpes com o objetivo de desenvolvimento de vacinas mais efetivas e seguras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Durante muitos anos foi dada uma grande ênfase à Febre Aftosa que deixou outras doenças víricas com escassez de informações e falta de reagentes apropriados ao diagnóstico (BOTTON et al., 1998). Mas com o controle da Febre Aftosa no Brasil, chegando, alguns estados, ao “status” de área livre, outras enfermidades que acarretam perdas econômicas significativas, vêm despertando interesse crescente de pecuaristas, técnicos, pesquisadores, autoridades sanitárias e, sobretudo, de laboratórios produtores de vacinas (FLORES et al., 2005).

Uma das doenças que merece atenção especial é a Diarreia Viral Bovina, em inglês denominada “Bovine Viral Diarrhea”, conhecida mundialmente pela sigla de BVD.

O vírus causador dessa doença é considerado como sendo um dos patógenos mais importantes de bovinos, pois é responsável por perdas econômicas para a pecuária bovina em todo mundo (BAKER, 1995).

A infecção pelo BVDV está associada a uma ampla variedade de manifestações clínicas: desde infecções inaparentes, ou com sinais leves, até uma enfermidade aguda fatal, o que dificulta a identificação rápida da doença a campo, necessitando assim da confirmação laboratorial. Esse foi o motivo pelo o qual os primeiros estudiosos da doença demoraram a suspeitar que muitas das sintomatologias clínicas observadas em diferentes animais eram na realidade ocasionadas pelo mesmo agente etiológico (CORRÊA, CORRÊA, 1992).

2.1. HISTÓRICO

Em 1946 Olafson e colaboradores, nos Estados Unidos e Childs no Canadá, simultaneamente descreveram uma enfermidade diarreica que apresentava alta morbidade, baixa mortalidade, de etiologia não definida, caracterizada por febre, diarreia, lesões nas mucosas e leucopenia. Essa leucopenia que era grave e observada nos animais afetados, foi o que indicou que se tratava de enfermidade com etiologia viral, e assim foi denominada de Diarreia Viral Bovina (RAMSEY, CHIVERS, 1953).

Mais tarde em 1953, Ramsey e Chivres descreveram uma doença idêntica, mas mais grave, onde se observou lesões ulcerativas nas mucosas e diarreia com fezes aquosas, por vezes sanguinolentas, que então foi chamada de Doença das Mucosas (DM). As lesões do trato gastrointestinal verificadas na DM eram muito mais graves que aquelas

observadas na BVD, e a DM afetava apenas alguns animais do rebanho, porém apresentou índices mais elevados de casos fatais (RAMSEY, CHIVERS, 1953).

Em 1956, Pritchard e colaboradores descreveram uma “enfermidade das mucosas” dos bovinos, no estado de Indiana – EUA e, como dito anteriormente, demorou até que fosse suspeitado que todas essas manifestações clínicas eram ocasionadas pelo mesmo agente (CORRÊA, CORRÊA, 1992).

Foi no final da década de 1960, através de estudos efetuados por Gillespie e colaboradores que os agentes virais isolados de animais com a BVD e DM foram considerados como sendo os mesmos, com pequenas alterações. Este agente etiológico ficou então nomeado como Vírus da Diarreia Viral Bovina/Doença das mucosas (GOENS, 2002).

Ainda na década de 1960, foi demonstrado que o BVDV estava antigenicamente relacionado com o vírus da peste suína clássica (CSFV – “Classical Swine Fever Virus”). Mais tarde, evidências sorológicas indicaram que o agente causador da doença das Fronteiras (BDV – “Border Disease Virus”) em ovinos também estava relacionado com o BVDV e CSFV (PLANT et al., 1973). Em 1973 este grupo de viroses foi denominado de *Pestivirus* (HORZINEK, 1973).

A investigação sobre a patogenia do complexo BVD/DM, depois que esse passou a ser conhecido, levou a estudos com infecções experimentais, na década de 1960 e 1970, que eram realizados, na maioria das vezes, em vacas prenhes e bezerros. Nessa ocasião, abortos e distúrbios teratogênicos foram encontrados e associados a infecções intrauterinas com o BVDV (MALMQUIST, 1968).

Essas infecções experimentais levaram, também, a descoberta de que bezerros infectados ainda no útero nasciam fracos e frequentemente não sobreviviam mais do que alguns meses, apresentando sintomatologia crônica, que já era conhecida como DM. Esses bezerros foram então identificados como persistentemente infectados com o BVDV. Achavam que esses animais PI tinham uma deficiência imunológica que não os faziam produzir anticorpos detectáveis contra o vírus (JOHNSON & MUSCOPLAT, 1973). Mas logo entenderam que a imunodeficiência estava só relacionada com o BVDV, uma vez que os mesmos animais foram capazes de produzir anticorpos para outros agentes infecciosos, tais como a o vírus da Rinotraqueíte Infecciosa Bovina, Parainfluenza 3 e a *Pasteurella hemolytica* (McCLURKIN et al., 1984).

No Brasil, o primeiro relato, feito no final da década de 60 por Corrêa e colaboradores (1968), foi uma descrição de doença gastroentérica, com aspectos clínicos e patológicos compatíveis com a forma clássica da infecção, a Doença das Mucosas, embora o vírus não tenha sido isolado, nem tão pouco estudos sorológicos tenham sido realizados. O primeiro estudo sorológico que evidenciou a presença de anticorpos anti-BVDV em

rebanhos brasileiros foi publicado em 1972, no estado do Rio Grande do Sul, onde foram detectados 39% de animais soropositivos em 229 soros examinados (WIZIGMANN et al., 1971). Mas o primeiro isolamento do vírus, a partir de soro de bezerro utilizado em cultura celular foi feito por Vidor em 1974.

Já na década de 1990 o vírus foi considerado como amplamente disseminado pelo rebanho brasileiro, com 47,7% de ocorrência quando realizada pesquisa sorológica de amostras (PITUCO, DEL FAVA, 1998).

Em 2001, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) adicionou a BVD à sua lista de doenças, tanto devido à sua propagação em nível internacional, como à sua importância para o comércio de animais. Sendo assim um forte sinal que a BVD estava se tornando uma prioridade internacional (LINDBERG et al., 2006).

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

O vírus da Diarreia Viral Bovina/Doença das Mucosas, em inglês denominado “Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease”, é um agente infeccioso de distribuição mundial, classificado na família *Flaviviridae*, e incluído, juntamente com os vírus da Peste Suína Clássica (CSFV) e o vírus da Doença das Fronteiras (BDV) dos ovinos, no gênero *Pestivirus* (ICTV, 2012).

A família *Flaviviridae* abriga vários vírus de importância em saúde humana e animal. É dividida em três gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*. Entre os *Flavivirus* estão o vírus da Febre Amarela (YFV – “Yellow Fever Virus”) e o vírus da Dengue, e o *Hepacivirus* tem como único membro o vírus da Hepatite C (HCV – “Hepatitis C Virus”), patógeno exclusivo de humanos (RIDPATH & FLORES, 2007).

Os *pestivirus* foram originalmente classificados nas espécies BVD, CSFV e BDV com base nos animais hospedeiros originários. Porém esta classificação mostrou-se problemática, pois alguns *pestivirus* não estão restritos somente a uma única espécie hospedeira (RIDPATH, 2005). Por exemplo, o BVDV já foi isolado de animais domésticos, como bovinos, ovinos, suínos, caprinos, e em animais selvagens (EVERMANN, BARRINGTON, 2005; GROOMS et al., 2006).

O BVDV é um vírus pequeno, com partícula esférica de 40 a 60 nanômetros de diâmetro e possui um envoltório lipoproteico derivado das membranas das células hospedeiras infectadas. O nucleocapsídeo, de simetria icosaédrica, tem como genoma uma fita única de RNA linear, de polaridade positiva, de aproximadamente 12,3 Kb de

comprimento, com predisposição a altas taxas de mutação, devido à presença de regiões hipervariáveis na glicoproteína E2 do vírus (RIDPATH & FLORES, 2007), (figura 1).

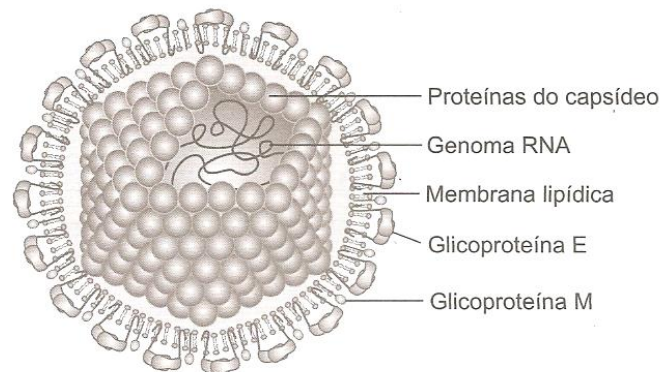


Figura 1 - Ilustração esquemática de uma partícula da família *Flaviviridae* com os seus componentes (RIDPATH & FLORES, 2007)

2.3. GENOMA DO BVDV

A organização deste genoma consiste em uma longa fita aberta de leitura (*Open Reading Frame* - ORF), com cerca de 4000 códons, contornada por duas regiões não traduzidas, 5'UTR (360-390 bases) e 3'UTR (200-240 bases) (RIDPATH, 2005), como mostra figura 2. A ORF é traduzida em uma única poliproteína, que é clivada pelas proteases virais e celulares, dando origem a 11 e 12 polipeptídeos estruturais e não estruturais (CHASE et al., 2004, RIDPATH, 2005), descritas nos quadros 1 e 2:

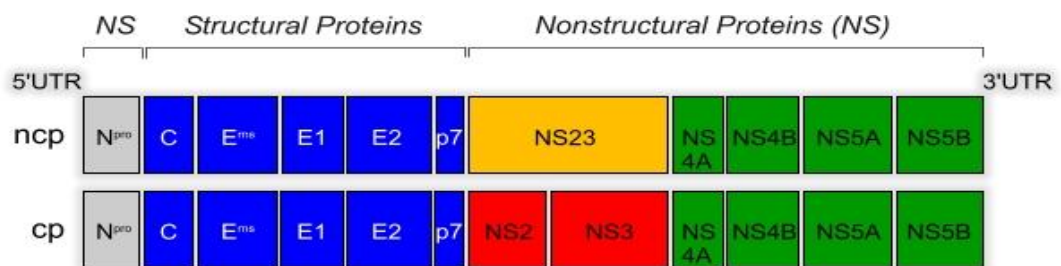


Figura 2 - Esquema do genoma do vírus da Diarreia Viral Bovina (<http://www.bvd-info.ch/images/stories/bvd/vet/genome.jpg>)

Quadro 1 - Descrição de proteínas estruturais do vírus da Diarreia Viral Bovina.

Proteínas Estruturais	Descrição
C	Proteína do capsídeo – forma a nucleocapside
Erns	Glicoproteína do envelope – induz a produção de anticorpos
E1	Glicoproteína do envelope
E2	Glicoproteína do envelope – possui epítomos e é indutora de anticorpos neutralizantes
p7	Função desconhecida – necessária para produzir vírus infeccioso

Fonte: CHASE et al., 2004, RIDPATH, 2005

Quadro 2 - Descrição de proteínas não-estruturais do vírus da Diarreia Viral Bovina

Proteínas Não – Estruturais	Descrição
N^{pro}	Autoproteólise
NS23 (NCP)	Anticorpos contra NS23 tem reação cruzada com outros <i>Pestivirus</i>
NS3 (CP)	Proteína que causa a citopatologia em células
NS2 (CP)	Aparece no biótipo citopatogênico
NS4A	Cofator da serina protease
NS4B	Componente da replicase
NS5A	Componente da replicase
NS5B	Atividade RNA Polimerase

CP = Citopatogenicidade

NCP = Não citopatogênica

Fonte: CHASE et al., 2004, RIDPATH, 2005

A região 5' UTR, a mais conservada dos *Pestivirus*, é grande (360-390 nucleotídeos) em comparação ao genoma completo (12.3-12.7 Kb) (PELLERIN et al., 1994). De acordo com a capacidade de produzir citopatologia em cultivo celular, O BVDV pode ser classificado em biótipo citopatogênico (CP – NS2 e NS3) isolados quase que exclusivamente de animais acometidos pela Doença das Mucosas e outro, não citopatogênico (NCP – NS23), que representam a grande maioria dos vírus isolados do campo (BAKER, 1995) (figura 2, quadro 1 e 2).

A alta frequência de mutações, a propensão à recombinação e a pressão seletiva pela resposta imune, estimulada por infecções naturais ou por vacinação, tem levado ao

surgimento de uma grande variedade de variantes genéticas e antigênicas do BVDV. Os epítopes neutralizantes da glicoproteína E2 são um dos locais primários onde ocorrem variações por mutação (BROCK et al., 2006).

Essas variações permitem classificá-los em dois genótipos: BVDV-1, associado às formas clássicas da diarreia viral bovina/doença das mucosas e que representam a maioria dos vírus vacinais e das estirpes referência, e BVDV-2 que foram inicialmente identificados em surtos de BVD aguda severa e doença hemorrágica na América do Norte (PELLERIN et al., 1994). Há também uma subclassificação de amostras do BVDV-1 em 11 subgenótipos, de 'a' até 'k' (VILCEK et al., 2004) e do BVDV-2 em pelo menos 2 subgrupos, a e b (PELLERIN et al., 1994; RIDPATH et al., 2000; TAJIMA & DUBOVI, 2005), porém a relevância clínica e epidemiológica dessas subdivisões ainda não estão esclarecidas (RIDPATH & FLORES, 2007).

No Brasil, Gil (1998) através da análise filogenética de 21 isolados brasileiros, revelou que 17 pertenciam ao genótipo BVDV-1 e quatro ao BVDV-2. Além disso, um estudo filogenético complementar, pela análise de uma sequência do gene da proteína não-estrutural NS3, revelou que os BVDV-2 brasileiros são distintos dos norte-americanos e europeus, constituindo um subgenótipo a parte, denominado provisoriamente de BVDV-2b (FLORES et al., 2002). Cortez et al., em 2006, verificaram 11 isolados brasileiros pertencentes ao BVDV-1, sendo oito do subgenótipo 1a e três ao 1b, e seis isolados de BVDV-2, dos quais dois de BVDV-2a e quatro de BVDV-2b.

Os dois genótipos podem ser diferenciados através de anticorpos monoclonais dirigidos contra as proteínas virais E2 e E^{ms} ou por análise genética (OIE, 2008). Todos os *pestivirus* são antigenicamente relacionados embora a reatividade sorológica cruzada entre as espécies, por exemplo entre BVDV-1 e BVDV-2, seja baixa, e isto apresenta implicações importantes para o diagnóstico e eficácia de vacinas (RIDPATH & FLORES, 2007).

Além das três espécies reconhecidas de *pestivirus*, tem sido proposta quatro espécies adicionais, que ainda aguardam uma classificação definitiva e que incluem o vírus Giraffe, associado a um surto semelhante a Doença das Mucosas em girafas; vírus Pronghorn, isolado de um antílope Pronghorn nos Estados Unidos; vírus Bungowannah, detectado em suínos, após um surto de natimortos na Austrália, e um grupo conhecido como HoBi-like, BVDV-3 ou *pestivirus* atípico (figura 3) (BAUERMAN et al., 2013).

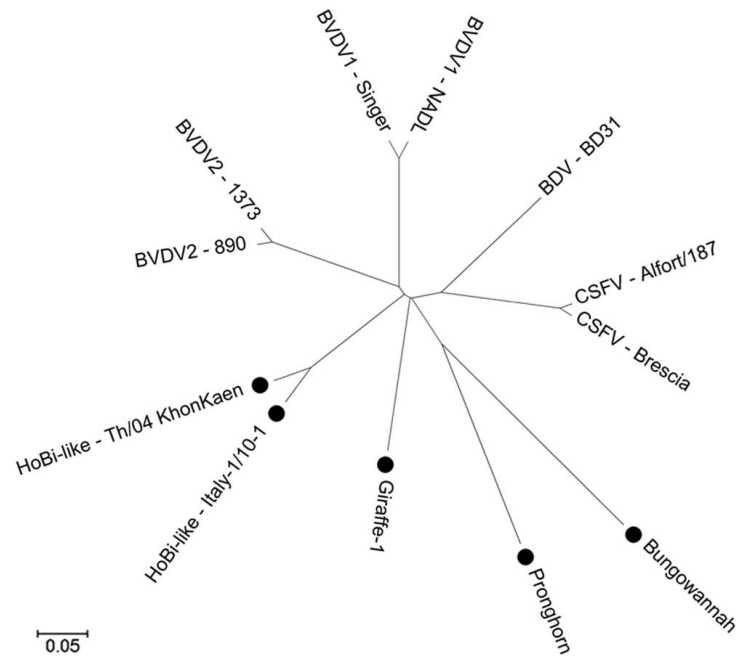


Figura 3 - Arvore filogenética do gênero *pestivirus*, representando as espécies oficiais e as atípicas (“HoBi-like”, Giraffe, Pronghorn e Bungowannah), marcadas com uma bola ao lado do nome (BAUERMANN et al., 2013)

O primeiro relato deste *pestivirus* atípico foi em 2004, isolado na Alemanha como contaminante de um soro fetal bovino (SFB) proveniente do Brasil, e chamado na ocasião de 'Hobi'_D32/00. Este foi o primeiro de vários relatórios descritos, e esse grupo de víruses ficou conhecido como “HoBi-like” vírus devido ao nome dado ao primeiro isolado (SCHIRRMIEIER et al., 2004).

A origem do “HoBi-like” vírus é desconhecida, mas uma hipótese é que o vírus se originou na América do Sul e foi introduzido em outros países e continentes por meio de produtos biológicos contaminados que foram comercializados, tais como vacinas e SFB (STÄHL et al., 2007).

Devido às diferenças nas propriedades genéticas e antigênicas desse *pestivirus* atípico para os descritos anteriormente, ele foi proposto como um representante de uma possível nova espécie. Alguns autores referem-se a este vírus como BVDV-3 devido a semelhança da sintomatologia clínica apresentada pelos animais após a infecção com BVDV e “HoBi-like” vírus. Porém existe uma resistência em declarar o “HoBi-like” como uma terceira espécie de BVD pois estes vírus são geneticamente distantes do BVDV-1 e BVDV-2, além de o diagnóstico e as vacinas usadas para o controle da BVDV-1 e 2 serem menos eficazes para este novo grupo (BAUERMANN et al., 2013).

Stalder e colaboradores (2005) também descreveram o vírus “HoBi-like”, isolado a partir de cultura de células contaminadas (provavelmente a partir de um lote de SFB

produzido na América do Sul) e a partir de um búfalo do Brasil; Cortez et al. (2006) detectou "HoBi-like" em fetos bovinos abortados também no Brasil; Ståhl et al. (2007) detectou um vírus relacionado com o atípico, no soro de um bezerro na Tailândia, e Kampa et al. (2008) também descreveram evidências do "HoBi-like" em rebanhos bovinos inseridos na Tailândia.

Embora sua origem seja desconhecida, através dos isolados, uma hipótese é que ele seja mesmo originário da América do Sul e foi introduzido a outros países como contaminantes de produtos biológicos, como SFB e vacinas. Dados não publicados indicam que mais de 30% dos lotes de SFB provenientes da América do Sul, testados na Europa, estão contaminados com o vírus HoBi-like o que sugere que esse vírus está espalhando nas populações de bovinos da América do Sul, especialmente em rebanhos no Brasil (BAUERMANN et al., 2013).

2.4. CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS

O período de incubação da BVD é de aproximadamente 5 a 7 dias e a viremia é detectada nas primeiras 24 horas após a infecção, podendo persistir por até 15 dias. Na maioria das vezes, as infecções nos bovinos ocorrem de forma inaparente ou pouco característica, com sinais de hipertermia transitória e leucopenia. Estima-se que 70% a 90% das infecções são assintomáticas (BAKER, 1995).

O BVDV é facilmente inativado pelo calor, resistindo até uma hora a 56°C, mas pode manter sua infectividade por 16 meses a - 40°C. Não é estável no ambiente, ficando viável apenas por 5 dias. Os vírus do gênero *pestivirus* são estáveis a pH entre 5,7 a 9,3, ficando instáveis acima ou abaixo destes valores, ao contrário dos demais vírus da família *Flaviviridae*. São rapidamente inativados por solventes orgânicos (éter e clorofórmio), detergentes e desinfetantes comuns, como fenóis e clorexidine (MOENNIG, 1990; GROOMS et al., 2006).

2.5. TRANSMISSÃO

Os animais infectados eliminam o vírus pelas mucosas nasais, oculares e bucal, assim como pelas fezes (SCHUCH, 2006), e o BVDV também já foi isolado de fluidos uterinos e leite. Assim o contato direto de indivíduos susceptíveis com um animal PI e/ou seus fluidos corporais é o modo mais eficiente de transmissão do vírus em condições

naturais, que também ocorre pelo contato direto com portadores de infecção aguda, apesar da quantidade de vírus ser consideravelmente menor e o período de eliminação mais limitado em comparação aos persistentemente infectados (GROOMS et al., 2006; SCHUCH, 2006).

O modo de infecção mais comum ocorre por meio da ingestão ou da inalação do vírus. Os aerossóis que infectam a mucosa nasal encontram-se suspensos no ar e podem manter infecciosidade em distâncias curtas, entre 1,5 metros a 10 metros de distância (EVERMANN, BARRINGTON, 2005; GROOMS et al., 2006).

A transmissão horizontal também pode ocorrer através de sêmen colhido de touros PI ou agudamente infectados pelo BVDV (FLORES et al., 2005; GROOMS, 2006; THURMOND, 2005).

Além disso, o homem pode contribuir para disseminação do vírus, por meio de instrumentos de trabalho, inseminação artificial, transferência de embriões, premunicação contra Babesiose e Anaplasmosse e vacinas contaminadas com o BVDV (MOENNIG, PLAGEMANN, 1992) além da possibilidade de transmissão indireta por meio de insetos hematófagos.

Também ocorre a transmissão vertical, por via uterina, quando a fêmea prenhe não possui anticorpos contra o BVDV e entra em contato com o vírus, ocorrendo dessa maneira a infecção transplacentária do feto (GROOMS et al., 2006).

A velocidade de transmissão do BVDV dentro dos rebanhos depende da prevalência de animais PI; da existência de áreas com alta densidade de animais; e da virulência das estirpes virais (HOUE, 1999; THURMOND, 2005). A introdução ou o nascimento de animais PI dentro de um rebanho pode resultar na rápida disseminação do vírus entre a maioria dos bovinos susceptíveis em menos de seis meses. Mas se a fonte do vírus for apenas bovinos com infecção aguda, a disseminação do BVDV no rebanho é mais lenta (GROOMS et al., 2006).

Além disso, a exposição a outros bovinos pela cerca entre vizinhos, pelos pastos comunitários ou por feiras e exposições, podem ser importantes vias de transmissão de rebanho para rebanho (HOUE, 1999; THURMOND, 2005).

2.6. EPIDEMIOLOGIA

O BVDV tem distribuição mundial e a frequência de animais portadores de anticorpos chega a atingir 70 a 80%, e de rebanhos na América do Norte e em alguns países europeus até 80% (FLORES et al., 2005).

Além da América do Norte, o BVDV já foi relatado em países como o Reino Unido, Escócia, Noruega, Dinamarca, Suécia, Alemanha, Áustria, Itália, Suíça, França, Espanha, Portugal, Brasil, Cuba, Uruguai, Chile, Jordânia, Nova Zelândia, Grécia, Bélgica, entre outros (GROOMS et al., 2006; BILLINIS et al., 2005; LETELLIER et al., 2005).

É um agente infeccioso cuja disseminação na população bovina do Brasil foi comprovada por meio de isolamentos e inquéritos sorológicos (PITUCO et al., 1997; FLORES et al., 2005). Vários relatos clínico-patológicos e sorológicos têm demonstrado a presença da infecção desde o final dos anos 60. No entanto, os primeiros estudos sorológicos da infecção no país datam do início da década de 70, no Rio Grande do Sul (WIZIGMANN et al. 1971). Desde então, diversos estudos têm sido realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro, cerca de 70% de animais sororeagentes (QUINCOZES, 2005).

O quadro 3 tem informações de estudos realizados no Brasil, e foi adaptado de FLORES e colaboradores (2005).

Quadro 3 - Estudos sorológicos da infecção pelo vírus da Diarreia Viral Bovina realizados no Brasil (1971-2004).

Local (estado)	Ano	Técnica	n	Positivos	Procedência	Referência
MG	1997	SN	287	61,47%	Bovinos de matadouros	Figueiredo et al., 1997
Vários	1999	ELISA	2.448	Ao lado	Amostras de vários estados: MG (65%), MS (84%), PR (67%), SP (78%), RS (73%), RJ (71%)	Richtzeinhain 1999
SE	1997	SN	102	64,7%	Bovinos de matadouros	Melo et al., 1997
RS	1998	ELISA	430	56%	Bovinos de corte - 19 propriedades (RS)	Canal et al., 1998
PR	2000	SN	937	73,47%	Amostras de 81 rebanhos de corte e leite em 74 municípios do PR	Médici et al., 2000
BA	2001	SN	220	56%	Bovinos de 1 a 4 anos de diferentes regiões da BA	Noronha et al., 2001
Vários	1999-2004	SN	17.090	51,34%	Amostras de vários estados, testadas no LVB/IBSP	Pituco 2004
GO	2002	ELISA/SN	452	35,2%; 34,5%	Fêmeas-bovinas (não vacinadas) de rebanhos leiteiros com problemas reprodutivos	Brito et al, 2002
GO	2003	SN	3.533	64%	Fêmeas bovinas com mais de 24 meses de idade, estado de Goiás	Alfaia et al., 2004

Fonte: FLORES et al., 2005

2.7. PATOGENIA

O vírus penetra no organismo pelas vias digestivas e aerógenas ou através de mucosas do aparelho reprodutor (LIEBERMAN, 1988). O epitélio do trato respiratório superior – porta de entrada preferencial do vírus -, orofaringe e o tecido linfóide regional parecem ser os sítios primários de replicação após a infecção pela via oro-nasal, (RIDPATH, FLORES, 2007). Por isso as lesões ocorrem primariamente no trato gastrointestinal, no sistema linfático e no trato respiratório superior (HIRSH & ZEE, 2003)

A replicação do genoma e a produção da progênie viral ocorrem inteiramente no citoplasma da célula hospedeira. A penetração dos vírions nas células ocorre por endocitose, após a interação entre proteínas do envelope viral e receptores da membrana plasmática. Acontece então a fusão do envelope com a membrana endossomal, o capsídeo dissocia-se, e o genoma é liberado no citoplasma. A replicação do genoma envolve a síntese de uma nova molécula de RNA que posteriormente será encapsidado e as novas partículas virais aparecem em vacúolos no citoplasma. Sua liberação ocorre pela fusão dessas vesículas com a membrana plasmática (BROWNLIE, 1990; RIDPATH, 2005). O pico máximo de liberação dos vírions ocorre entre 12 e 42 horas após a infecção. Cada célula é capaz de produzir de 100 a 1.000 novos virions, e as primeiras partículas são liberadas 10 horas após a infecção celular (DENG, BROCK, 1993).

Com a infecção, o epitélio escamoso do trato digestório superior apresenta úlceras róseas bem demarcadas que ocorrem no pulvino dental, no palato, nas superfícies ventral e lateral da língua, nas gengivas dos dentes incisivos, na superfície mucosa das gengivas, no focinho e nas porções rostrais das narinas. Úlceras semelhantes ocorrem, embora menos frequente, na faringe (CARLTON & MCGAVIN, 1998).

No esôfago, úlceras pequenas e irregulares frequentemente se unem para formar úlceras lineares (CARLTON & MCGAVIN, 1998). O abomaso se apresenta inflamado e edematoso (HIRSH & ZEE, 2003). O intestino delgado tem a mucosa hiperêmica, salpicada por petéquias e conteúdo líquido, misturado a estrias de muco e células epiteliais descamadas (CARLTON & MCGAVIN, 1998).

Depressão linfóide ou lesões das células imunocompetentes é freqüentemente observada. Linfonodos do trato gastrointestinal podem estar aumentados (HIRSH & ZEE, 2003).

Em bezerros infectados por via congênita, pode-se observar hiperplasia cerebelar, catarata, degeneração e hipoplasia da retina e neurite de nervos ópticos. Imunocomplexos constituídos de BVD, anticorpos antivirais e complemento podem ser encontrados no glomérulo renal dos bovinos doentes (HIRSH & ZEE, 2003).

2.8. SINAIS CLÍNICOS

As consequências e severidade da infecção aguda pelo BVDV dependem de uma série de fatores que incluem a cepa viral (e o biótipo), a condição imunológica e reprodutiva do animal e a ocorrência de infecções secundárias (RIDPATH, FLORES, 2007).

Desde sua descoberta, uma grande variedade de manifestações clínicas foram associadas com a infecção por este agente. Essas manifestações podem ser agrupadas em três formas principais: doença aguda leve (gastrentérica e respiratória), doença aguda severa (gastrentérica, respiratória e hemorrágica) e doença das mucosas (RIDPATH, FLORES, 2007).

Estima-se que 70 a 90% das infecções pelo BVDV em animais imunocompetentes e soronegativos ocorram sem manifestações clínicas (EVERMANN, BARRINGTON, 2005). Muitos animais infectados pelo BVDV apresentam infecções subclínicas que apenas provocam febre ligeira (passando despercebida), leucopenia por linfopenia e desenvolvimento de anticorpos neutralizantes. As infecções subclínicas explicam os títulos de soroneutralização positiva para BVDV encontrados na maioria dos bovinos não vacinados (GROOMS et al., 2006). Em vacas de leite, a diminuição da produção leiteira tem sido associada com infecções subclínicas (EVERMANN, BARRINGTON, 2005).

A infecção aguda leve pelo BVDV é frequentemente definida pelas manifestações clínicas que ocorrem em bovinos imunocompetentes que não são PI (LIEBLER-TENORIO, 2005). Os animais aqui apresentam inapetência, depressão, febre, diarreia ligeira, leucopenia transitória. Contudo, a duração dos sinais clínicos é variável e depende do tempo de viremia, virulência do vírus infectante e presença de infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2000) A doença é autolimitante e transitória, leve ou por vezes inaparente, com alta morbidade (30 a 90%) e mortalidade muito baixa ou ausente (FLORES et al., 2005; OIE, 2008)

Em infecção aguda severa observa-se os gânglios linfáticos aumentados de tamanho, erosões e ulcerações do trato gastrointestinal, hemorragias petequiais na superfícies serosa das vísceras. Nesta forma a pneumonia deverá ser o quadro clínico mais observado (RADOSTITS et al., 2000). Em infecções desse tipo podem ocorrer a síndrome hemorrágica, caracterizado por uma trombocitopenia marcada, diarreia sanguinolenta, hemorragias nas superfícies mucosas da boca e vulva, hifema, pirexia (41-42°C), desidratação, leucopenia e morte (GROOMS et al., 2006). No início acreditava-se que o BVDV 2 era o mais patogênico e causador da síndrome hemorrágica, no entanto hoje sabe-se que ambos causam infecções agudas severas (HOUE, 2003). Além de bovinos jovens,

onde apresenta alta mortalidade, pode afetar bovinos adultos (FLORES et al., 2005; OIE, 2008).

Mas as maiores consequências da infecção pelo BVDV parecem estar relacionadas com as perdas reprodutivas (RIDPATH, FLORES, 2007). Em muitos rebanhos onde a infecção é endêmica, falhas reprodutivas representam os sinais mais evidentes - e por vezes os únicos - da presença da infecção (BAKER, 1995). Geralmente ocorre diminuição da taxa de concepção e repetição de cio (LIEBLER-TENORIO, 2005). Em novilhas e vacas, infecções agudas com BVDV podem ocasionar ovarites, o que resulta em infertilidade temporária desses animais (ROBERT et al., 2004).

Após infecção das fêmeas prenhes, o BVDV é capaz de atravessar a placenta e infectar o feto (FLORES et al., 2005; KAHN, 2007). Mas as consequências da infecção fetal são determinadas pela fase da gestação em que a fêmea é infectada, biótipo (CP/NCP) e pela estirpe do vírus (FLORES et al., 2005; LIEBLER-TENORIO, 2005).

Quando ocorre primo infecção por BVDV em novilhas logo após inseminação artificial ou monta natural, diminuem as taxas de concepção por uma dificuldade de fixação do embrião ao útero, ou mesmo que essa fixação ocorra pode haver morte embrionária e perda precoce de gestação, sendo o embrião reabsorvido (EVERMANN, BARRINGTON, 2005).

Se a infecção ocorrer em fêmea gestante não imune, o vírus tem a capacidade de atravessar a barreira transplacentária e invadir o feto, e dependendo do seu estágio de desenvolvimento pode ocorrer reabsorção embrionária, atraso no crescimento fetal, morte fetal, abortos, defeitos congênitos como má formação no sistema nervoso central, deficiências oculares, ou então o nascimento de bezerras infectadas para toda a vida e sem manifestações clínicas, chamados PI (ANDREWS et al., 2004; FULTON et al., 2003; GROOMS et al., 2006, LIEBLER-TENORIO, 2005).

Mas se a infecção ocorrer no último terço de gestação (após os 150 dias), pode haver resposta imunológica e eliminação do vírus pelo feto (BROCK, 2004; OIE, 2008). O animal nasce portador de anticorpos, mas livre do vírus. Abortamentos podem ocorrer em qualquer fase da gestação apesar destes serem mais comuns no primeiro trimestre de gestação (GROOMS et al., 2006; LIEBLER-TENORIO, 2005).

2.9. ANIMAIS PERSISTENTEMENTE INFECTADOS (PI)

A infecção de vacas prenhes com uma cepa não citopatogênica antes do amadurecimento do sistema imune do feto, entre 45 a 125 dias de gestação, pode resultar em nascimento de bezerras PI. O feto nesse período não desenvolve anticorpos contra o

vírus, reconhecendo-o como próprio do seu organismo. Os bezerros que assim nascem podem parecer clinicamente saudáveis, no entanto são virêmicos e eliminam o vírus constantemente e em grandes quantidades em secreções e excreções (DEREGT, LOEWEN, 1995; FLORES, 2003; KAHN, 2007). Por isso são considerados os grandes disseminadores da doença.

Os animais PI tem maior probabilidade de contraírem outras doenças, por isso tem menor tempo de vida, sendo que é frequente a morte antes dos 2 anos de idade. Além disso podem desenvolver a doença das mucosas se forem infectados simultaneamente por cepa citopatogênica homóloga (FLORES et al., 2005; KAHN, 2007). Observa-se uma taxa de mortalidade de 50% nos 12 primeiros meses de vida e acredita-se que menos de 10% das novilhas PI atingem a fase reprodutiva (GROOMS et al., 2006, LIEBLER-TENORIO, 2005).

A doença das mucosas é uma enfermidade gastroentérica fatal, e desencadeada quando um animal PI (portador de um BVDV-NCP) sofre infecção concomitante com BVDV-CP antigenicamente semelhante. O BVDV-CP que determina o desenvolvimento da DM geralmente se origina do BVDV-NCP do próprio animal por mutações, portanto nos animais, que desenvolvem a DM, os dois vírus (NCP e CP) estão presentes (RIDPATH, FLORES, 2007). A DM afeta animais entre os 6 meses e os 2 anos de idade, possui baixa morbidade e mortalidade próxima dos 100% (ANDREWS et al., 2004; FLORES et al., 2005).

Estudos mostram que a prevalência dos bovinos PI esteja compreendida entre 0,5% e 2% da população geral de bovinos (FLORES et al., 2005; GROOMS et al., 2006; HOUE, 1999; OIE, 2008).

2.10. DIAGNÓSTICO

A ampla variedade de sinais clínicos, não patognomônicos, que estão presente também em outras doenças infecciosas e parasitárias, dificulta o diagnóstico definitivo da BVD (SANDVIK, 1999).

Portanto, o diagnóstico de BVD baseia-se na verificação de resposta imunológica do hospedeiro à infecção ou na detecção do vírus ou dos componentes virais. Assim os métodos são classificados em indiretos, quando pesquisa-se anticorpos contra o vírus, e diretos quando a detecção é do vírus, antígenos ou ácidos nucleicos virais (RIDPATH, FLORES, 2007).

O diagnóstico indireto realizado para BVDV geralmente é feito pela técnica de virusneutralização (VN) ou ELISA “(enzyme-linked immunosorbent assay)” indireto. Mas animais infectados de forma aguda, soroconvertem em 14-20 dias após a detecção inicial,

assim são necessárias amostras pareadas para confirmar infecção recente (SCHUCH, 2006).

A VN tem como desvantagem ser trabalhosa, requer a manutenção de linhagens celulares e maior tempo para a obtenção dos resultados. Um problema que existe em relação a essa técnica é que, sem padrões estabelecidos, existe uma grande variação nos resultados de diferentes laboratórios, pois tudo depende da linhagem celular e estirpe viral, usadas para a detecção dos anticorpos contra o vírus (DUBOVI, 2013). Já o ELISA indireto é realizado utilizando-se kits comerciais, que por serem importados no Brasil são de alto custo.

Como diagnóstico direto, pode ser utilizado o isolamento viral em cultura de células, porém esse método é demorado (cerca de 30 dias), necessita de estrutura de cultivo celular tornando o processo laborioso e de alto custo, além do que ele deve ser seguido pela identificação do vírus por métodos como imunofluorescência, imunoperoxidase, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) e a reação em cadeia pela polimerase (PCR), já que alguns biótipos do vírus não produzem efeito citopatogênico em camadas celulares. Além disso, estudos demonstram que o resultado do isolamento depende da linhagem celular utilizada, gerando impacto na capacidade de detectar o vírus infeccioso (DUBOVI, 2013).

O ELISA direto, que identifica uma proteína viral, apresenta como vantagem a possibilidade de conclusão dos resultados em poucas horas, mas a dependência de *kits* comerciais importados gera problemas relacionados ao custo e disponibilidade do produto em tempo (PILZ et al., 2005). A chave para o sucesso desse teste é uma amostra clínica que tenha quantidade suficiente de antígeno presente para gerar um sinal positivo, e também o teste deve identificar uma região alvo do vírus que seja conservada o suficiente para ser encontrada na maioria das estirpes virais circulantes, além disso o antígeno alvo deve ter região altamente conservada, que seja encontrada em todas as estirpes virais (DUBOVI, 2013). Duas proteínas do BVDV foram identificadas como regiões alvo potenciais, a NS3 e a E^{ms}. A proteína NS3 é altamente conservada entre todas as estirpes de BVDV, mas sua concentração pode ser baixa fora de células infectadas. Já a E^{ms} é altamente conservada também e um anticorpo monoclonal existente reconhece todas as estirpes testadas até o momento. As amostras de eleição são o soro e biópsia de pele do animal (DUBOVI, 2013). A desvantagem do teste é que como ele depende do antígeno ser capturado por um anticorpo monoclonal específico, anticorpos policlonais contra o vírus que estão na amostra teste podem bloquear a detecção do antígeno. A possibilidade de falsos negativos deve ser sempre motivo de preocupação (DUBOVI, 2013).

Métodos de diagnóstico molecular, incluindo a PCR e mais recentemente a PCR em tempo real estão sendo universalmente adotados para o diagnóstico etiológico de diversas viroses animais, pois apresentam como vantagem a rapidez na obtenção dos resultados,

detecta tanto partículas infecciosas quanto não infecciosas e, quando devidamente padronizadas, são muito específicas e sensíveis (TAKIUCHI et al.,2005).

2.10.1 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

A reação em cadeia pela polimerase (em inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR) é um método enzimático para amplificação *in vitro*, em escala experimental, de sequências de DNA. Para que a reação ocorra é necessária uma molécula de DNA alvo, que serve como molde da reação. A primeira etapa começa com a desnaturação da dupla fita do DNA, por rompimento das pontes de hidrogênio, realizada pelo aumento de temperatura, mais ou menos 94°C. Logo após, pequenas moléculas com segmentos específicos do DNA, os oligonucleotídeos iniciadores, também conhecidos como *primers*, que são quimicamente sintetizados e de cadeia simples, se ligam a sequência-alvo a ser amplificada, e essa é a segunda etapa conhecida como hibridização (“anelamento”). A terceira etapa ocorre com a ajuda das enzimas polimerases, que fazem a extensão da nova fita de DNA, pela incorporação dos nucleotídeos, até que se formam outras muitas cópias idênticas as originais (figura 4) (POWLEDGE, 2004).

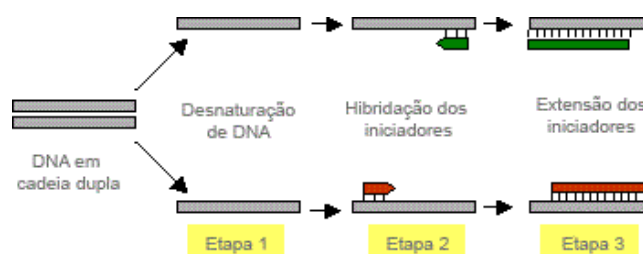


Figura 4 – Esquema das etapas da reação em cadeia pela polimerase (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>)

Esse processo é repetido diversas vezes para multiplicação das cópias, até que ao final haverá milhares de cópias do DNA original, uma vez que a replicação ocorre de maneira exponencial, como demonstrado na figura 5 (POWLEDGE, 2004):

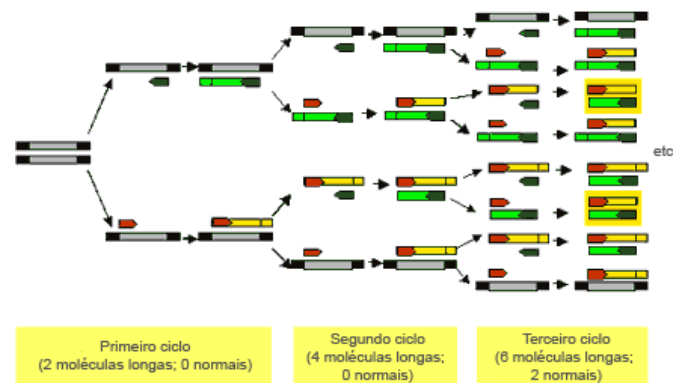


Figura 5 – Esquema da síntese de cópias de DNA, feitas através da PCR (<http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>)

Quando a reação possui como molde inicial uma molécula de RNA, antes de todo o processo citado acima, ocorre à transcrição reversa (reverse transcription - RT), que transforma o RNA em um DNA complementar (cDNA). Para isso é utilizada a enzima transcriptase reversa, que é aquecida aproximadamente a 45°C, por 30 a 60 minutos. Após a produção do cDNA, a PCR ocorre normalmente (VALASEK & REPA, 2005).

Uma das vantagens desse método é a possibilidade de escolha do gene do DNA que se deseja amplificar, para isso basta que a síntese dos oligonucleotídeos seja complementar ao gene de interesse, e então a identificação será exatamente da região do genoma escolhida.

Tradicionalmente a detecção do DNA amplificado é feita pela eletroforese em gel de agarose, com coloração por intercalantes de DNA dupla fita, por exemplo, por brometo de etídio ou gel red, que fará com que o acúmulo das fitas de DNA “brilhem” quando expostas a luz ultravioleta. Mas o grau de precisão é limitado uma vez que a discriminação é feita pelo tamanho do fragmento em pares de base (pb) (KIDD et al., 2000).

Mais recentemente surgiu a PCR em tempo real, que consiste na mesma técnica da PCR convencional, porém permite amplificação e detecção simultâneas de sequências de ácidos nucleicos. Nesse caso, a amplificação está associada a compostos, chamados de sondas, que emitem fluorescência no decorrer da reação, após serem estimuladas com uma fonte emissora de luz, tendo correlação direta com o número de cópias do gene-alvo amplificados. A rapidez com que o sinal de fluorescência atinge um nível de limiar está diretamente ligada com a quantidade do alvo presente na amostra, sendo, portanto, um teste quantitativo (diferente da PCR convencional que é um teste qualitativo), e por isso, também conhecido como PCR quantitativa (qPCR). Assim durante a amplificação um programa de computador específico (software) constrói, em tempo real, um gráfico

relacionando os ciclos de termociclagem com a intensidade de fluorescência emitida durante a amplificação do DNA das amostras (VALASEK & REPA, 2005).

A qPCR, que possui mais de uma funcionalidade, tem como uma das opções de resultado, a quantificação absoluta do vírus, sendo que a carga viral é medida através do número de cópias de RNA ou DNA existentes na amostra. Para esse cálculo o software utiliza uma curva padrão como base para a comparação da amostra desconhecida, gerada através de uma diluição seriada de RNA ou DNA molde. Quando a amostra original for um RNA, a curva padrão deve ser produzida a partir do produto do RNA transcrito *in vitro* e quando a amostra original for um DNA, a curva poderá ser formada por um plasmídeo de DNA (CHEN et al., 2005 *apud* BOWERS & DHAR, 2011).

Os sistemas de detecção da fluorescência na qPCR podem ser separados em sistemas específicos de detecção e não específicos (WHITCOMBE, et al., 1999). O sistema não específico é composto por moléculas fluorescentes ligantes de DNA dupla fita (“minor groove”). Nesse grupo está o SYBR Green (MORRISON et al., 1998), que fluoresce quando ligado a qualquer DNA de dupla fita, o que indica que ele conseguirá se ligar a amostras diversas, não sendo necessariamente o seu gene de interesse. Por isso este sistema é menos específico, mas é mais barato e não sofre com variações da amostra (KOMURIAN-PRADEL et al., 2001). A desvantagem é que podem ocorrer ligações desse fluoróforo com amplificações não específicas do produto, como, por exemplo, ligações entre os *primers*, ocasionando resultados falso-positivos (HALFORD, 1999). Esse problema pode ser verificado com a análise que o software do programa faz da curva de “melting”, ou curva de dissociação. Nesse caso é determinado o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos *primers* de suas sequências-alvo, verificando através dessa temperatura se houve a formação de um único produto ou se produtos inespecíficos também foram formados. Um único pico na curva de “melting” sugere a existência de um único produto, porém se for observado a existência de vários picos na curva, pode-se considerar a hipótese de formação de produtos inespecíficos na reação (NASCIMENTO et al., 2012), embora para que a especificidade seja confirmada deve ser feito o sequenciamento do produto.

Já no sistema TaqMan, são usadas sondas lineares de hidrólise, e no decorrer da reação ocorre uma hibridização da sonda fluorescente na região complementar alvo do DNA. A sonda possui um fluoróforo ligado na extremidade 5', também conhecido por *reporter* (R), o qual é responsável pela emissão da fluorescência, e um composto denominado *quencher* (Q) localizado no terminal 3' que impede a emissão da fluorescência do repórter quando a sonda está intacta. Durante a extensão realizada pela enzima polimerase, a partir do primer senso, ocorre clivagem da porção 5' da sonda (pela ação 5' exonuclease da enzima) com consequente emissão da fluorescência. Sendo esse o motivo

da reação de amplificação ser diretamente proporcional à fluorescência emitida (MACKAY et al., 2002).

Vale ressaltar que a eficiência das reações de amplificação por RT-PCR e qRT-PCR dependem de diversos fatores, tais como: o cuidado na pipetagem, a qualidade e integridade das amostras (molde de RNA/cDNA e DNA), desenho dos primers, desenho das sondas (quando o sistema utilizado for a TaqMan), condições de termociclagem (temperatura de desnaturação, anelamento dos primers), qualidade e quantidade dos reagentes e também o tamanho do produto a ser amplificado. Condições específicas para cada experimento devem ser padronizadas (NASCIMENTO et al., 2012).

A qPCR tem sido muito utilizada nos últimos anos por ser um teste rápido e de alta sensibilidade, pois possibilita a detecção de sequências genômicas mesmo em amostras nos quais os microorganismos encontram-se em títulos muito baixos, inativados ou mesmo em amostras altamente diluídas (BHUDEVI, WEINSTOCK, 2003).

Mais vantagens dessa técnica estão relacionadas com o fato de não existir manipulação pós-amplificação, ficando o processo com um “sistema fechado”, o que diminui, embora não elimine, as chances de resultados falso-positivos e ou contaminações cruzadas entre amostras (HIGUCHI, et al., 1993). Outra vantagem em relação a PCR convencional é a eliminação do uso direto pelo operador de soluções mutagênicas como o brometo de etídio (MACKAY et al., 2002).

2.11. TRATAMENTO

Nenhum tratamento específico está disponível para animais que apresentem sinais clínicos da infecção com o BVDV (RADOSTITS et al., 2000). Os objetivos do tratamento em bovinos suspeitos de infecção aguda são de suporte, visando amenizar sinais como desidratação, febre, etc, e prevenção de infecção secundária (GROOMS et al., 2006). São indicados antibióticos de largo espectro, fluidoterapia, eletrólitos suplementares e vitaminas (KAHN, 2007). Aos bovinos com evidências clínicas de hemorragia devido à trombocitopenia podem-se efetuar transfusões de sangue total fresco, e controlar ao máximo a população de insetos para evitar lesões múltiplas que possam originar hemorragias.

2.12. PREVENÇÃO E CONTROLE

Todo o controle da BVD baseia-se na vigilância sistemática da doença para que se consiga diminuir a prevalência de animais PI, os principais disseminadores do vírus. Portanto o controle deve ser direcionado para detecção e eliminação desses animais, além da vacinação sistemática de fêmeas prevenindo a infecção fetal (DUBOVI, 1992). Dessa maneira, a prevenção da infecção pré-natal e o nascimento de animais PI tornam-se a base do controle da doença o qual implica em um restrito controle de vacas mães e filhos. Ao evitar a exposição de animais gestantes ao BVDV nos primeiros 5 meses de gestação, isso irá quebrar o ciclo da persistência (BROCK et al., 2005). Bovinos que nascem PI representam um fator de perpetuidade do vírus no rebanho (BROWNLIE, 1990; SANDVIK, 1999).

Além disso, boas práticas de biossegurança são essenciais para o controle e prevenção da BVD. A introdução de animais, especialmente fêmeas prenhes, é a forma mais comum para que o vírus se introduza em explorações de leite ou carne. A compra de novilhas, vacas ou touros deve ser acompanhada por atestado negativo para o BVDV, assegurando que os animais não estão persistentemente infectados e nem com a doença aguda. Também o período de quarentena deve ser à base de todos os procedimentos de biossegurança, prevenindo a entrada de infecções transitórias (agudas) (BROCK et al., 2005).

A vacinação é usada para proteger animais da doença clínica, reduzir a circulação do vírus e para tentar impedir a infecção fetal e a consequente produção dos animais PI (FLORES, 2003). Contudo, existem dúvidas se as vacinas existentes e os protocolos vacinais são efetivos para prevenir totalmente as infecções transplacentárias (LINDBERG et al., 2006). Outra preocupação com a eficácia de vacinas contra o BVDV refere-se à grande variabilidade antigênica entre os isolados locais e estes isolados apresentam uma baixa reatividade sorológica cruzada com as cepas norte-americanas utilizadas as vacinas (FLORES et al., 2005). Estão disponíveis no mercado internacional vacinas contendo vírus vivo modificado ou com vírus inativado (RADOSTITS et al., 2000). Nos Estados Unidos estão disponíveis mais de 150 vacinas comerciais (FULTON, BURGE, 2001). No Brasil apenas vacinas inativadas são permitidas, e estas contêm cepas norte-americanas de BVDV-1.

2.13. PERDAS ECONÔMICAS

As perdas econômicas decorrentes de doenças que afetam os animais podem ser divididas em custos diretos - que são os impactos diretos e visíveis nos animais, como a morte ou também a diminuição da produção de carne e leite, ovos, além de perdas no comércio de produtos derivado dos animais, como peles, produtos farmacêuticos - e os custos indiretos, que incluem esforços na prevenção e controle, os impactos sobre a saúde humana, entre outros. Todas as perdas diretas podem ser expressas em unidades monetárias, enquanto que as perdas indiretas são, geralmente, mais difíceis de serem quantificadas (HOWE et al., 2013).

As estimativas de perdas econômicas devido à infecção pelo BVDV variam de acordo com o estado imunitário do rebanho, o período gestacional das fêmeas no momento da infecção e a virulência das estirpes virais (HOUE, 1999). Os custos podem variar de 13 €/vaca/ano (R\$ 34,00/vaca/ano – abril/2013) a 160 €/vaca/ano (R\$ 419,20/vaca/ano – abril/2013) (podendo chegar a 410 €/vaca/ano (R\$ 1.074,20/vaca/ano – abril/2013), quando a estirpe viral é altamente infecciosa). Porém as estimativas são feitas, na maioria das vezes, de estudos de casos que ocorrem em rebanhos com sintomatologia grave de BVD, e que levaram o proprietário a realização do diagnóstico, sendo assim, em rebanhos sem sintomatologia clínica, as perdas diretas com a doença, ficam despercebidas, assim como a própria doença (FOURICHON et al., 2005).

Os prejuízos diretos de animais infectados com o vírus incluem diminuição da produção leiteira, diminuição da taxa de concepção, distúrbios respiratórios, associação de outras doenças devido à imunossupressão e até a morte de animais com infecção aguda, além dos abortos e malformações de fetos (CHI et al., 2002; GUNN et al., 2005; HOUE, 2003). As perdas reprodutivas são as consequências economicamente mais importantes associadas à infecção pelo BVDV (GROOMS, 2006). As perdas são maiores ainda quando ocorrem surtos da doença (RADOSTITS et al., 2000).

Um exemplo dessa perda é que quando há exposição do rebanho ao BVDV há um aumento de 7% na incidência de mamites (HOUE, 2003), tendo grande impacto econômico, pois provocam, em média, custos totais de aproximadamente onze euros (R\$ 28,82 – abril/2013) por 1.000 litros de leite, o que equivale a aproximadamente 78,00 €/vaca/ano (R\$ 204,36/vaca/ano – abril/2013) (FOURICHON et al., 2005).

Nas vacas de leite, em caso de surtos, os custos podem ascender aos 96 €/vaca/ano (R\$251,52/vaca/ano – abril/2013) (GUNN et al., 2004). Por sua vez, nas explorações de carne as perdas podem atingir os 58 €/vaca/ano (R\$ 151,96/vaca/ano – abril/2013) (GUNN et al., 2004). Essas diferenças ocorrem entre rebanho de corte e de leite porque para cada

tipo de criação existem diferentes manejos que, ora separam os bezerros das vacas, ora esses vivem juntamente por longos períodos. Em alguns casos existem épocas específicas de parição, em outros, os partos acontecem o ano todo, e todas essas diferenças interferem na transmissão da doença entre os animais do rebanho, além da chance ser maior ou menor do nascimento de animais PI e, conseqüentemente, da grande transmissão ou não do vírus dentro do rebanho (GUNN et al., 2004).

Em oito rebanhos leiteiros dinamarqueses contendo em média 115 animais, foram calculados, das perdas devido a BVD, aproximadamente \$ 13 (R\$ 26,00 – abril/2013) a aproximadamente \$ 39 (R\$ 78,00 – abril/2013) por animal (HOUE et al., 1994).

Contudo, na maioria dos casos, os custos calculados apenas incluem as perdas diretas, como abortamentos e morte dos animais (GUNN et al., 2005; HOUE, 2003), evidenciando a necessidade de maiores estudos em relação às perdas reais com a doença. Além do que, como dito anteriormente, animais com a BVD tem maiores chances de apresentarem doenças concomitantes o que causaria ainda mais perdas, além das estirpes virais mais virulentas. Como por exemplo, na descrição de um surto de infecção aguda com BVDV e infecção concomitante com Leptospirose em um rebanho leiteiro com 183 vacas leiteiras, onde 15 vacas morreram, 20 vacas tiveram que ser descartadas (principalmente por causa de infertilidade), houve 40 abortos, natimortos e de 18 bezerros, três morreram logo após o nascimento (PRITCHARD et al., 1989). O custo total para o agricultor foi estimada em mais de £ 50.000 (aproximadamente R\$ 150.000,00 – abril/2013), ou seja, 819,70 reais por vaca (HOUE, 2003).

Um investimento é um sacrifício de hoje em prol da obtenção de uma série de benefícios futuros. Sob o enfoque das finanças, sacrifícios e benefícios futuros dizem respeito a fluxos de caixas necessários e gerados pelo investimento, assim antes de tomar a decisão sobre certos investimentos, é coerente que sejam feitos estudos econômicos que avaliam a viabilidade do mesmo (CASAROTTO FILHO, 2009).

A decisão de um investimento deve considerar:

- a) Critérios econômicos: rentabilidade do investimento
- b) Critérios financeiros: disponibilidade de recursos
- c) Critérios imponderáveis: fatores não conversíveis em dinheiro

Vê-se, portanto, que a análise econômico-financeira pode não ser suficiente na tomada de decisões. Para análise global do investimento, pode ser necessário considerar fatores não quantificáveis, sendo necessário um conjunto de informações de natureza quantitativa e qualitativa (CASAROTTO FILHO, 2009). Em certos casos até, a alternativa mais econômica não é a melhor solução, em função dos dados não monetários, ou não quantificáveis.

Estudar economicamente a saúde animal é uma ferramenta para apoiar a tomada de decisões na seleção de estratégias de controle das doenças, porém isso é uma prática de pesquisa relativamente nova. Países da União Europeia têm adotado estratégias com base na ideia “prevenir é melhor do que remediar” (HOWE et al., 2013). É necessário que sejam feitos estudos, também em relação à análise custo-benefício dos testes diagnósticos, que são utilizados nos programas de controle e prevenção das doenças. Se os testes forem vistos como investimento para a produção pecuária, poderão tornar-se grandes aliados (HOUE, 2003).

Evitar perdas na produção requer gastos com recursos em profilaxia. Para justificar investimento fixos com a prevenção, pressupõe-se que, ao longo do tempo, os benefícios devem ser suficientes para cobrir os custos, o que se entende pela análise custo-benefício. (HOWE et al., 2013).

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo:

- Validação da qRT-PCR para o diagnóstico da Diarreia Viral Bovina.
- Avaliar a relação custo-benefício da qRT-PCR em comparação a RT-PCR convencional para o diagnóstico de BVDV.
- Comparação dos resultados das amostras de SFB feitas pela qRT-PCR com os métodos convencionais (RT-PCR e ELISA antígeno).
- Avaliar a frequência de anticorpos em lotes de soro fetais bovinos reagentes ao BVDV pela técnica de virusneutralização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM

Foram selecionados, de maneira aleatória, 172 lotes de SFB, encaminhadas para diagnóstico ao Laboratório de Viroses de Bovídeos (LVB) do Instituto Biológico (IB), no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2012.

Após serem feitas alíquotas de 2 mL de cada lote, estas ficaram estocadas em freezer a - 80°C até o momento da análise.

4.2. PRODUÇÃO DE LOTES DE SFB

Os lotes comerciais de SFB, de diversos fabricantes, incluídos no experimento foram produzidos a partir de um “pool” de soro de fetos, oriundos de fêmeas bovinas prenhes, abatidas em frigorífico do sudeste e centro-oeste do Brasil (comunicação pessoal).

Procedimento de produção:

As fêmeas prenhes eram identificadas antes do abate, realizado exame clínico geral para avaliação da condição sanitária. Logo após o abate os fetos acima de 03 meses de gestação eram transferidos para um local apropriado dentro do abatedouro para realização da sangria por punção cardíaca. O sangue de cada feto foram sendo armazenado em bolsas de coleta de 1 litro até completar. As bolsas foram mantidas em temperatura ambiente até coagular o sangue e então submetidas a centrifugação. O soro foi separado e acondicionado em galões de 05 litros. Para cada litro de soro foram necessários cerca de 2 a 3 fetos (dependendo da idade). Cada galão é analisado por espectrofotometria para avaliação de proteína (Obs.: alguns são descartados nesse momento). Após a obtenção de quantidade suficiente de soro para a produção de um lote com cerca de 100 a 150 litros de soro fetal foi feita a filtração em membrana filtrante e aplicada radiação ultravioleta para, respectivamente, eliminar e inativar possíveis partículas virais. Este volume está baseado na capacidade máxima de filtração da membrana. O soro filtrado foi novamente armazenado em galões de 5 litros. Frações deste pool de soro foram colhidas para exames sanitários requeridos de acordo com a finalidade e legislação do país. Para comercialização o SFB geralmente é envasado em frascos de 500 mL. Considerando que para cada litro de soro

são necessários 2 a 3 fetos, e cada lote é formado por um total de 100 a 150 litros, então cada lote fica composto por 325 fetos em média (variando de 200 a 450 fetos).

4.3. PADRÕES

4.3.1. VÍRUS PADRÃO

Utilizou-se o BVDV-1 citopatogênico, estirpe NADL (VR-1422 - ATCC), gentilmente cedida pelo Instituto de Virologia da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover – Alemanha, e o BVDV-2 estirpe VS-253, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eduardo Furtado Flores, da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.

Os genes dos vírus utilizados como padrões foram sequenciados, e suas sequências foram alinhadas com genomas do BVDV-1 e BVDV-2 disponíveis no *Genbank*® (BVD-1 acesso N° M31182.1 e BVD-2 acesso N° FJ387322.1), o banco de sequências genéticas publicado online. O resultado do alinhamento indicou que eram de fato estirpes representativas do biótipo 1 e 2 do vírus (anexos 4 e 5, respectivamente).

4.3.2. CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DE SORO FETAL BOVINO

Para determinar a sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e qRT-PCR, foram feitas diluições seriadas na base 10, dos dois vírus utilizados como padrão, ambos estavam com o título de $10^{5,0}$ TCID₅₀/50µL (Dose infecciosa 50% para cultura de tecidos), iniciando em 10^4 até 10^{-1} TCID₅₀/50µl para o BVDV-1 e até 10^{-2} TCID₅₀/50µl para o BVDV-2, conforme o quadro 4, e as diluições foram preparadas em SFB previamente testado por isolamento viral e RT-PCR convencional e que apresentaram resultado negativo ao BVDV.

Quadro 4 - Diluição seriada do BVDV

TCID ₅₀ /50µL	Diluição	Doses
10 ^{5.0}	Solução estoque	100.000
10 ^{4.0}	1/10 (10 ⁻¹)	10.000
10 ^{3.0}	1/100 (10 ⁻²)	1000
10 ^{2.0}	1/1000 (10 ⁻³)	100
10 ^{1.0}	1/10.000 (10 ⁻⁴)	10
10 ^{0.0}	1/100.000 (10 ⁻⁵)	1dose
10 ^{-1.0}	1/1000.000 (10 ⁻⁶)	0,1 dose
10 ^{-2.0}	1/10.000.000 (10 ⁻⁷)	0,01 dose

4.3.3. CURVA PADRÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Para a formação da curva padrão procedeu-se a extração da solução estoque do BVDV-1 (NADL), que em seguida foi amplificado com *primers* para o gene 5'UTR por RT-PCR convencional e clonado no vetor pGEM-T Easy Vector (Promega). Os clones obtidos foram purificados utilizando o Kit PCR Clean-Up (Promega) e quantificados por espectrofotometria. O produto foi visualizado em gel de agarose para verificar se a inserção da sequência estava correta.

Com o produto clonado procedeu-se a síntese de RNA, que foi feita utilizando o kit Riboprobe® in vitro Transcription Systems (Promega), conforme instruções do fabricante.

Para o cálculo de cópias de RNA por µL, do RNA sintético, foi usada a fórmula a seguir:

$$\text{Cópias RNA}/\mu\text{L} = \frac{\text{xg}/\mu\text{L de RNA}}{\text{pb do transcrito} \times 320} \times 6,022 \times 10^{23}$$

Com o resultado de cópias de RNA por µL foi feita a diluição seriada na base 10 e montou-se a curva padrão utilizada para padronização e validação do teste.

4.3.4. SOROS CONTROLE

Utilizou-se como controle positivo da RT-PCR convencional a diluição 10^{-4} (10^1 TCID₅₀/50 μ L) do vírus BVDV-NADL, que foi a última diluição apresentando resultado positivo para cada triplicata feita. Preconizou-se usar como controle positivo, a última diluição viral que obteve resultado positivo no teste de validação, para que o limiar da prova ficasse o mais baixo possível. O controle positivo fica, dessa maneira, com uma banda fraca no gel de agarose, porém o intuito é certificar-se de que a reação está mesmo detectando a menor diluição possível do vírus.

Como controle negativo amostras de SFB negativas que foram previamente testadas por RT-PCR convencional, ELISA_{Ag} e isolamento viral no LVB.

4.4. CULTURAS CELULARES

Foram utilizadas células da linhagem de epitélio renal bovino “Madin Darby Bovine Kidney” (MDBK) adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC, Manassas, EUA).

As células foram cultivadas em garrafas de poliestireno próprias para cultivo celular (TPP, Techno Plastic Products AG®, Switzerland) em meio de crescimento, composto por Meio Essencial Mínimo (MEM – Nutricell®, Campinas, Brasil), acrescido de 0,2% de bicarbonato de sódio (Merck®, Darmstadt, Alemanha), tamponado com 25 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanossulfônico (HEPES – Biosolve®, Westford, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino esterilizado, inativado e testado por isolamento viral, ELISA_{Ag} e RT-PCR convencional para garantia de ser livre de pestivirus (SFB – Nutricell®, Campinas, Brasil). Foram mantidas em câmara estufa, da marca Eletrolab®, à temperatura de 37°C.

Para a manutenção das linhagens, o repique das células foi feito entre três e cinco dias, utilizando-se solução de Tripsina-Versene (Sigma- Aldrich®, Steinheim, Alemanha) para a individualização das células, (concentração cerca 2×10^5 /mL). Para obtenção das suspensões de células utilizadas nas reações de VN, o repique foi realizado da mesma forma, sendo que a contagem das células para preparação da diluição necessária (3×10^5 /mL) foi efetuada em câmara de Neubauer (Optik Labor®, Friedrichshofen, Alemanha).

4.5. REPLICAÇÃO VIRAL

Para a replicação viral inoculou-se o vírus padrão em garrafa contendo monocamada de células MDBK pré-formada, preparada com 24 horas de antecedência à inoculação.

O inóculo foi incubado em estufa com 5% de CO₂ e umidade controlada, a 37°C por 1h para adsorção nas células. Após a incubação foi acrescentado meio de crescimento com 1% de antibióticos [Penicilina G Potássica 11.200 UI/mL; Estreptomicina 0,01 g/mL; Gentamicina 0,01 g/mL; L-Glutamina 0,029 g/mL e Anfotericina B 0,5 mg/mL (Cultilab®, Campinas, Brasil)], e novamente incubado.

Os cultivos de células foram observados diariamente até o aparecimento de efeito citopático do vírus. Quando este efeito atingiu cerca de 90% da monocamada celular, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado em tubos estéreis a 600 x g/15 minutos/4°C. Após a centrifugação, a suspensão viral foi distribuída em frações de 1 mL em tubos de criogenia (TPP, Techno Plastic Products AG®, Switzerland). Estes foram devidamente identificados com o tipo de vírus, partida, data e armazenados em nitrogênio líquido a -196° C até o momento da utilização.

4.6. TITULAÇÃO VIRAL

Para determinação do título do vírus, as partidas foram testadas em oito diluições seriadas na razão dez (10^{-1} a 10^{-8}) em meio MEM com 1% de antibióticos. Foram distribuídas em microplaca de fundo chato (TPP, *Techno Plastic Products* AG®, Switzerland) 50µL das diluições do vírus (oito repetições por diluição) e 50µL de suspensão de células, na concentração de 3×10^5 células/mL. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e umidade controlada. A leitura foi feita 96 horas após a incubação com a utilização de microscópio invertido. O cálculo do título viral foi realizado pelo método de Reed e Muench (1938).

4.7. DETECÇÃO DO BVDV

4.7.1. TESTES MOLECULARES

4.7.1.1. EXTRAÇÃO DO RNA

A extração do RNA viral dos lotes de SFB e das alíquotas de solução estoque do BVDV foram feitas empregando-se o TRIZOL® LS Reagent (Invitrogen®), em microtubos de 1500 µL, de acordo com as instruções do fabricante com algumas modificações.

Para cada 250 µL da amostra foram acrescentados 750 µL de isotiocianato de guanidina e fenol (Trizol® LS Reagent - Invitrogen™) e após serem misturados com o auxílio do vórtex ficaram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Adicionou-se então 200 µL de clorofórmio (Merck) e agitou-se em vórtex por 30 segundos. Foram novamente incubados por 5 minutos de a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos entre 2-8°C e ao término da centrifugação aspirou-se a fase aquosa superior (aprox. 400 µL) transferindo-a para um novo tubo. Precipitou-se com 500 µL de isopropanol (Merck), procedeu-se a homogeneização por inversão e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi novamente centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 2-8°C e após desprezou-se o sobrenadante. Ao fim lavou-se o pellet com 1 mL de etanol 75% e homogeneizou-se por inversão. Centrifugou-se agora a 10.000 x g por 5 minutos. Retirou-se o etanol com auxílio da pipeta e procedeu-se mais uma lavagem com 1 mL de etanol absoluto (Merck) e homogeneizou-se por inversão. Centrifugou-se novamente a 10.000 x g por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e o tubo foi deixado aberto à temperatura ambiente por 5 minutos até secagem do etanol. Por fim dissolveu-se o pellet em 50 µL de água DEPC (Promega), com auxílio da pipeta e o RNA extraído ficou estocado a -80°C até o uso.

4.7.2. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) CONVENCIONAL – ONE STEP

A técnica foi realizada de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante do kit comercial Access Quick™ RT-PCR System (PROMEGA). A reação foi feita para um total de 25 µL contendo 12,5 µL de Access Quick Master mix 1X (Tris-HCl, KCl, dNTP mix,

3mM de MgCl₂), 1,25 µL do *primer* senso a 10 µM e 1,25 µL do *primer* antissenso também a 10 µM, 0,5 µL de AMV reverse transcriptase e 4,5 µL de *Nuclease free water* (Promega). Por fim acrescentou-se 5 µL do RNA da amostra extraída.

Após terem sido feitos testes de gradiente de temperaturas as condições para amplificação ficaram determinadas como as seguintes: 45°C por 45 minutos para transcrição reversa, 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 72°C por 5 minutos para a extensão final.

4.7.2.1. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (*PRIMERS*)

Foram utilizados *primers* que detectam regiões comuns para BVDV 1 e 2, baseados em uma sequência de 290 nucleotídeos, localizados na região 5' não traduzida (5'UTR) altamente conservadas do genoma viral, com apenas alguns nucleotídeos da proteína não estrutural N^{pro} (figura 6), indicados no quadro 5. As sequências dos *primers* foram analisadas pelo BLAST, e obtiveram 100% de identidade com o vírus BVDV-1 e BVDV-2.

Quadro 5 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na RT-PCR convencional para BVDV

Nome	Autor	Sequência	Localização do Genoma
103	Weinstock et al, 2001	5' TAG CCA TGC CCT TAG TAG GAC 3'	103 Pb - 124 pb
372	Weinstock et al, 2001	5' ACT CCA TGT GCC ATG TAC AGC 3'	372 Pb – 392 pb

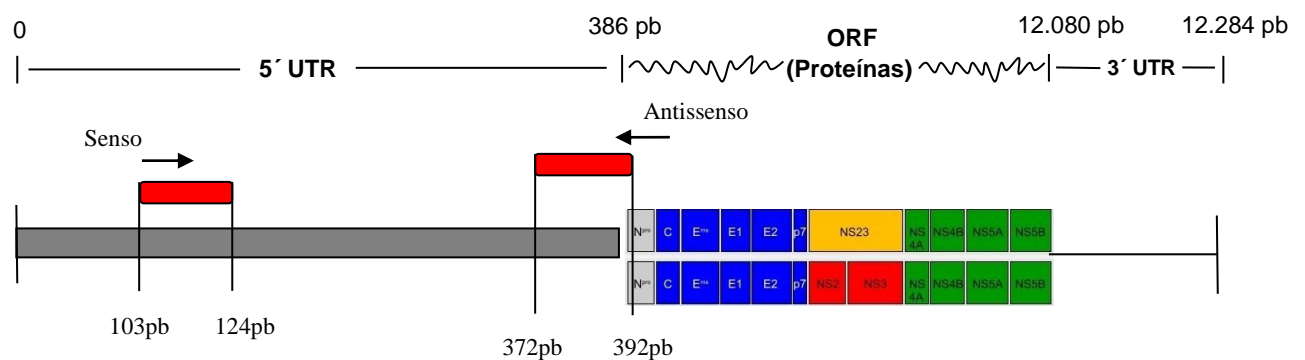


Figura 6 - Esquema da posição dos oligonucleotídeos iniciadores na região 5'UTR do genoma viral

44.7.2.2. RESULTADOS - ELETROFORESE

O produto da amplificação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X à voltagem constante de 100V por 1 hora. Os amplicons foram evidenciados após coloração com Gel Red diluído (1:150) em *Nuclease free water* (Promega) e a visualização foi feita no 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 de BVDV (quadro 6) e negativo quando houve ausência de banda.

Quadro 6 - Descrição do tamanho do produto do BVDV pela RT-PCR convencional

Patógeno	Técnica	Tamanho produto amplificado
BVDV	RT-PCR CONVENCIONAL	290 Pb

4.7.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Para o desenvolvimento da qRT-PCR, utilizou-se o equipamento Light Cycler 480 (Roche), disponível no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico.

Na qRT-PCR foi utilizado o sistema TaqMan, com filtro de detecção FAM, feita com o kit comercial da Applied Biosystems™ - VetMAX™- *Gold BVDV Detection Kit*, onde já estavam inclusos os *primers* e a sondas, que detectam tanto o BVDV-1 como do BVDV-2, embora não seja possível fazer a discriminação entre eles. O kit é padronizado pela empresa fabricante, e as sequências de *primers* e sondas não são informadas, porém o kit está apto para detecção do gene 5'UTR do vírus. Além disso possui um controle positivo com 10⁴ cópias de RNA/μL.

Em todas as reações foi utilizada uma nova curva padrão, feita com diluições do RNA sintético.

Foram seguidas as instruções do fabricante: a reação *one-step* foi feita para um total de 25 μL contendo, por amostra, 12,5 μL do RT-PCR Buffer 2X, 1,0 μL de BVDV Primer Probe Mix 25X, 1,0 μL da RT-PCR Enzyme Mix e 2,5 μL de *Nuclease free Water*, formando

um total de 17 μL de master mix, que foi dispensado na placa da reação. Por fim acrescentou-se 8,0 μL de RNA no poço da amostra teste, 8,0 μL de Nuclease-free Water no poço do controle negativo e no poço do controle positivo foi adicionado 1,0 μL de BVDV Control RNA 25X, 1,0 μL de Xeno™ RNA Control e 6,0 μL de Nucleic Acid Dilution Solution, todos fornecidos pelo kit.

As condições de amplificação, também sugeridas pelo fabricante, foram as representadas no quadro 7:

Quadro 7 - Condições de amplificação da qRT-PCR

Transcrição Reversa				
Ciclo: 1			Modo de análise: None	
Target (°C)	Acquisition mode	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
45	None	00:10:00	4.4	

Desnaturação				
Ciclo: 1			Modo de análise: None	
Target (°C)	Acquisition mode	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
95	None	00:10:00	4.4	

Amplificação				
Ciclo: 50			Modo de análise: None	
Target (°C)	Acquisition mode	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
95	None	00:00:15	4.4	
60	None	00:00:45	2.2	

Resfriamento				
Ciclo: 1			Modo de análise: None	
Target (°C)	Acquisition mode	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)
40	None	00:00:10	2.2	

4.7.3.1. GARANTIA DA QUALIDADE DA REAÇÃO

A garantia de qualidade da reação foi realizada a partir do ciclo de *threshold* (Cp) analisado pelo software do Light Cycler 480. Os limites de detecção da qRT-PCR foram determinados como a última diluição do controle de RNA sintético que apresentaram curva no gráfico da reação, indicando que houve emissão de fluorescência. Resultados serão

considerados negativos quando a amostra não apresentar nenhum valor de Cp e de concentração.

4.7.4. ELISA ANTÍGENO

As amostras de soro fetais foram analisadas por ELISA-Ag (Kit de teste para detecção de antígeno do Vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV)/soro Plus - Idexx Laboratories™), seguindo as instruções do fabricante.

A pesquisa de antígeno nos soros fetais foi realizada pelo teste de ELISA de captura. O teste foi realizado em placas de microtitulação com anticorpos monoclonais específicos para BVDV (E^{rns}), onde o antígeno presente na amostra é capturado, depois de um período de incubação de 2 horas à 37°C. Em seguida a placa foi lavada com solução de lavagem apropriada e adicionado o conjugado anti – bovino peroxidase horseadish, o qual detecta os anticorpos de captura contra BVDV, e incubado 30 minutos. Em seguida, a placa foi novamente lavada e uma solução de substrato/cromógeno foi adicionada. Na presença da enzima, o substrato é convertido em um produto que reage com ação do cromógeno para gerar uma coloração azul. Após período de incubação de 10 minutos, em local escuro, foi adicionado uma solução de bloqueio, e uma coloração amarela foi gerada. A absorbância foi medida em um comprimento de onda duplo de 450nm e 620nm utilizando um espectrofotometro (Modelo Multiskan Ascent nº 354- Labsystems).

4.8. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-BVDV

4.8.1. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO

Para pesquisa de anticorpos no SFB, foi utilizado o método de virusneutralização, segundo recomendações da OIE (2008).

Antes de se iniciar a VN, todas as amostras de soro fetal bovino foram submetidas à inativação da cascata de complemento, por incubação em banho-maria à temperatura de 56°C por 30 minutos. Este procedimento se faz necessário, pois o sistema complemento pode interferir nos resultados dos exames.

O teste foi feito em placas de microtitulação de 96 orifícios. A coluna 1 da placa teste foi utilizada como controle de célula, a coluna 2 como controle de toxicidade de cada amostra. Na coluna 3 adicionou-se 20µL do soro teste e 80µL de meio MEM e nas colunas 4 a 12 acrescentou-se 50µL de meio MEM. Transferiu-se então 50µL da coluna 3 até a 12 iniciando diluição seriada (1:5) até (1:2560).

Feita a diluição das amostras, adicionou-se à placa 50µL da suspensão viral, contendo 200 TCID₅₀/mL do vírus (diluição final 100 TCID₅₀/mL), exceto no controle de célula e de soro, colunas 1 e 2, ficando assim a diluição de 1:10 até 1:5120.

Na placa controle, foi feita a retitulação do mesmo vírus utilizado, para o conhecimento do título da suspensão viral. As colunas 1 a 4 e 6 a 9 serviram de controle positivo e receberam 50 µL de cada diluição viral (diluição seriada na base 10) preparada previamente, e as colunas 11 e 12 como controle de célula.

Todas as placas foram incubadas por uma hora em estufa 37°C com 5% de CO₂ e em seguida foi adicionado 50 µL da suspensão de célula MDBK na concentração 3x10⁵ células/mL.

Após 96 horas em estufa 37°C com 5% de CO₂, foi observado se ocorreu ou não o efeito citopático (ECP) na camada celular, em microscópio invertido.

Amostras de soro com títulos iguais ou superiores a 10 foram consideradas reagentes ao vírus.

4.8.1.1. GARANTIA DA QUALIDADE DA REAÇÃO

Para o resultado da reação de vírusneutralização ser aceito foi necessário que:

- Os controles de células não apresentassem alterações morfológicas;
- Não ocorressem variações maiores que $\pm 0,3$ log no título do vírus observado na placa de retitulação (REED; MUENCH, 1938);
- As doses infectantes situaram-se entre 30 e 300 TCID₅₀/ (OIE, 2008).
- Os títulos de anticorpos dos soros controle C+++ , C++ e C+ mantiveram-se de acordo com o conhecido, aceitando-se variações 0,3 log;

4.9. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Para análise estatística e comparação dos resultados obtidos no diagnóstico das amostras teste, pelos diferentes métodos diretos empregados nesse trabalho (ELISA antígeno, RT-PCR convencional e qRT-PCR) foi utilizado o programa estatístico WIN Episcope versão 2.0 (2004), com nível de confiança de 95%, que determina através do índice *Kappa*, o grau de concordância entre as técnicas comparadas.

4.10. ANÁLISE CUSTO-BENEFÍCIO DA RT-PCR (CONVENCIONAL E EM TEMPO REAL)

Para a análise custo-benefício das técnicas, foram feitas cotações de todos os materiais, equipamentos, reagentes e serviços utilizados na realização da PCR convencional e da qPCR (anexo 6 e 7), com o intuito de determinar o custo total gerado para a análise de uma amostra, quando realizada por uma dessas provas. Além disso, foram incluídos os valores de gastos com água, energia elétrica, mão de obra, certificação e manutenção de equipamentos e materiais e a depreciação desses equipamentos.

A tabulação dos valores foi feita no programa Microsoft Excel® 2010. Os gastos foram separados em custos fixos – aqueles que não dependem diretamente da quantidade de provas para serem gerados –, e em custos variáveis – aqueles que apresentam relação direta com a quantidade de provas realizadas (quadro 8).

Quadro 8 – Relação dos itens incluídos nos custos fixos e variáveis da análise custo-benefício.

Custos Fixos	Custos Variáveis
Materiais fixos	Materiais descartáveis
Equipamentos	Reagentes
Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	Equipamentos de Proteção Individual
Mão de Obra	-----
Água e Energia Elétrica	-----
Certificação de equipamentos e materiais	-----

4.10.1. CUSTO FIXO

Para chegar ao valor do custo fixo do laboratório (quadro 9), foram somados os gastos com:

A1. Depreciação dos bens duráveis e semiduráveis. Este gasto refere-se à depreciação dos equipamentos e materiais fixos (ex. provetas e pipetas) que, ao longo do tempo, vão perdendo valor com o desgaste natural do uso. Para esse cálculo dividiu-se o custo total de cada item pelo tempo de sua vida útil, calculada em meses. Chegou-se a um valor mensal de depreciação por produto e o valor da depreciação de todos os itens fixos foi somado, gerando um custo de depreciação total por mês, que ilustra o custo mensal dos equipamentos para o laboratório.

A2. Certificação. É o gasto com a certificação e calibração de equipamentos e materiais fixos. Com o uso, os equipamentos e materiais vão perdendo sua calibração e conseqüentemente a certificação de qualidade, por isso, anualmente devem passar por esse processo, até que, após alguns anos de acompanhamento, o processo possa ocorrer em um período mais espaçado de tempo.

A3. Mão de Obra Operacional. Refere-se ao gasto que se tem com os funcionários que realizam o diagnóstico. Para este caso foi considerada a necessidade de dois funcionários, sendo que na qPCR a mão de obra deve ser mais qualificada, quando em comparação à PCR convencional, por ser uma técnica mais laboriosa, que necessita de mais precisão e conhecimento. Neste cálculo já estão inclusos os encargos trabalhistas.

A4. Mão de Obra Administrativa. É o gasto com funcionários que realizam a parte administrativa, burocrática e também de gerenciamento do laboratório. Também já incluso os encargos trabalhistas. No presente trabalho foram considerados os valores de duas recepcionistas de amostras, uma que identifica e registra e a outra que prepara a amostra para o momento do diagnóstico, duas pesquisadoras que fazem o gerenciamento das atividades e uma secretária que emite os laudos com os resultados e entrega ao cliente.

A5. Água e Energia Elétrica. Neste item foram inclusos os gastos com as despesas de água e luz do laboratório. Como o Laboratório de Vírus de Bovídeos (LVB) fica dentro do Instituto Biológico (IB), e as contas de água e luz são conjuntas com outros laboratórios, dividiu-se a conta total, tanto de água como de luz, pelo número de laboratórios existentes no IB, que é 30, e considerou-se a conta do LVB como sendo uma parte da total.

Lembrando que esse cálculo foi feito separadamente para a PCR convencional e para a qPCR.

4.10.2. CUSTO VARIÁVEL

Para o cálculo do custo variável das provas, ou seja, custo com reagentes e materiais descartáveis (custo B no quadro 9), foi feito o cálculo da seguinte maneira: o valor total de cada item foi multiplicado pela porcentagem de uso daquele item para a realização do diagnóstico de uma amostra, e assim chegou-se a um valor total do item por amostra. O valor total do item por amostra, de todos os custos variáveis, foi somado e obteve-se um custo variável total por amostra.

4.10.3. CUSTO TOTAL MÉDIO FINAL

Para o cálculo final do valor do diagnóstico por amostra, primeiro foi preciso transformar o custo variável por amostra, em custo variável por mês, e para isso, calculou-se a capacidade máxima de exames em um mês (custo B.1 no quadro 9). Multiplicou-se, então, o custo variável por amostra pela capacidade máxima de exames por mês, obtendo-se assim um custo variável por mês.

Ao final somou-se o custo fixo total por mês ao custo variável total por mês, e o valor dessa soma foi dividido pela quantidade máxima de amostras feitas em um mês, chegando assim ao custo total médio, ou custo por amostra.

Para o cálculo da quantidade máxima de amostras realizadas em um mês, considerou-se 1.000 para a RT-PCR convencional, número retirado de relatórios mensais do LVB/IB. Já na qRT-PCR, por ser um teste mais ágil - já que a reação é feita em apenas duas etapas, diferente da RT-PCR convencional que necessita de três etapas -, e também por ser automatizado, considerou-se o dobro do número de amostras possíveis de ser feitas em um mês, passando para 2.000 amostras. Dessa maneira chegou-se em um custo total médio por amostra. Por fim, somou-se 28% do valor do custo total médio por amostra, referente a 25% para reserva de gestão do IB e 3% de taxas bancárias por emissão de boletos, entre outros, chegando assim ao valor custo total médio final por exame, como demonstrado no quadro 9:

Quadro 9 – Itens somados para o cálculo do custo total médio por exame

Custos	RT-PCR	qRT-PCR	Variação (%)
A. Custo fixo (R\$/mês)	R\$ -	R\$ -	
A.1. Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	R\$ -	R\$ -	
A.2. Certificação	R\$ -	R\$ -	
A.3. Mão de obra operacional	R\$ -	R\$ -	
A.4. Mão de obra administrativa	R\$ -	R\$ -	
A.5. Água e energia elétrica	R\$ -	R\$ -	
B. Custo variável (R\$/mês)	R\$ -	R\$ -	
B.1. Custo variável (R\$/exame)	R\$ -	R\$ -	
B.2. Número de exames/mês			
C. Custo total (R\$/mês)	R\$ -	R\$ -	
B.2. Número de exames/mês			
D. Custo total médio (R\$/exame)	R\$ -	R\$ -	
E. 28% - Reserva de gestão IB (25%) + Taxas bancárias (3%)	R\$ -	R\$ -	
F. Custo total médio final (R\$/exame)	R\$ -	R\$ -	

5. RESULTADOS

5.1. SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (RT-PCR) CONVENCIONAL - ONE STEP

O resultado das análises para avaliação da sensibilidade analítica da RT-PCR mostraram que o limiar de detecção do teste foi de 10^1 TCID₅₀/50µL para o BVDV-1 e 10^0 TCID₅₀/50µL para o BVDV-2, diluição na qual todas as amostras em triplicata, apresentaram resultados positivos. Como mostram as figuras 7 (BVDV-1) e 8 (BVDV-2):

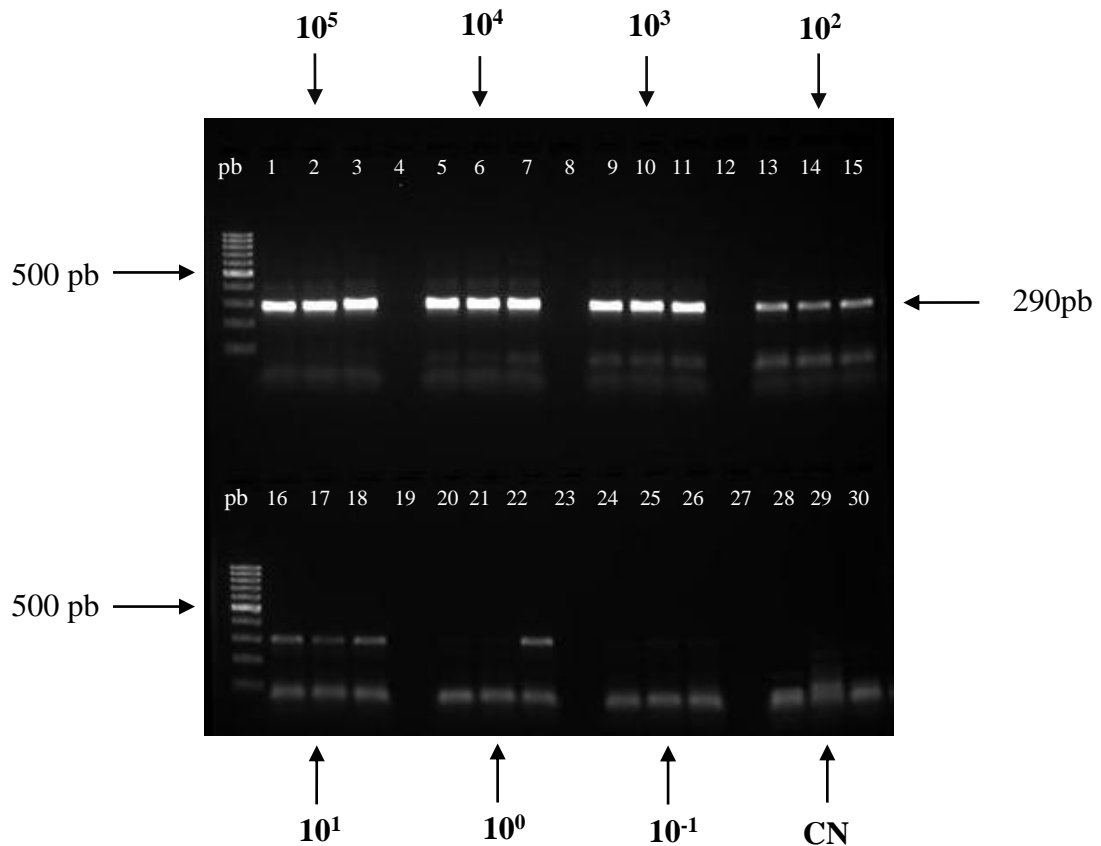


Figura 7 - Gel de eletroforese, com a reação de validação da RT-PCR convencional para BVDV-1. pb: DNA ladder de 100 pb (Invitrogen®); canaletas 4,8,12,19,23,27: Branco; canaletas 1-3: BVDV-1 10^5 ; canaletas 5-7: BVDV-1 10^4 ; canaletas 9-11: BVDV-1 10^3 ; canaleta 13-15: BVDV-1 10^2 ; canaletas 16-18: BVDV-1 10^1 ; canaletas 20-22: BVDV-1 10^0 ; canaletas 24-26: BVDV-1 10^{-1} ; canaletas 28-30: controle negativo (CN).

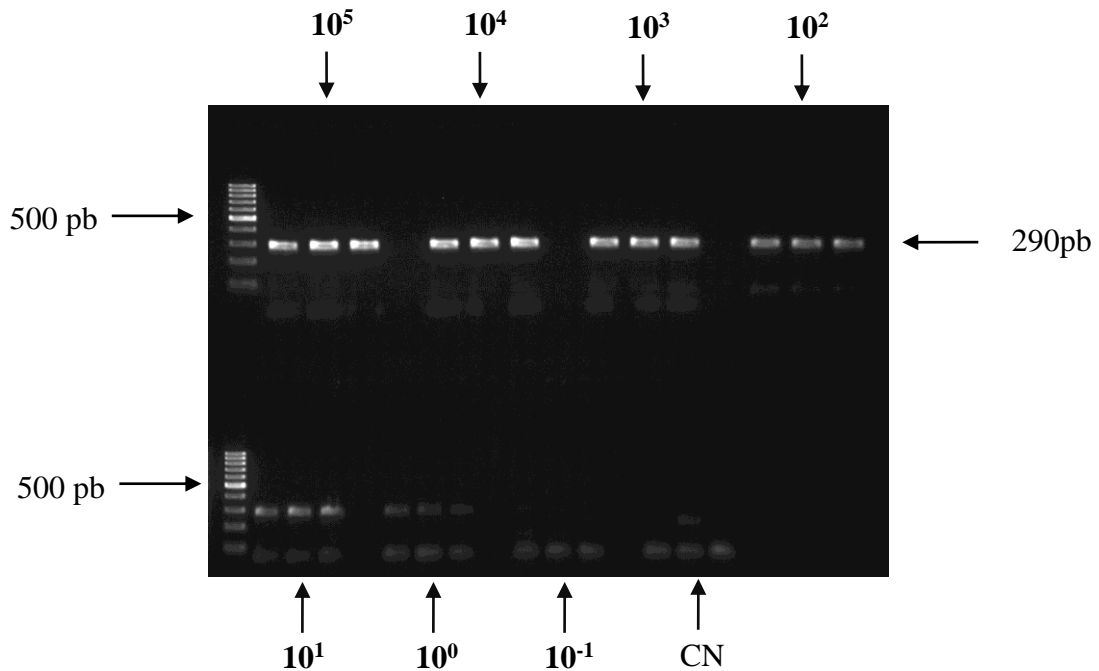


Figura 8 - Gel de eletroforese, com a reação de validação da RT-PCR convencional para BVDV-2. pb: DNA ladder de 100 pb (Invitrogen®); canaletas 4,8,12,19,23,27: Branco; canaletas 1-3: BVDV-2 10^5 ; canaletas 5-7: BVDV-2 10^4 ; canaletas 9-11: BVDV-2 10^3 ; canaleta 13-15: BVDV-2 10^2 ; canaletas 16-18: BVDV-2 10^1 ; canaletas 20-22: BVDV-2 10^0 ; canaletas 24-26: BVDV-2 10^{-1} ; canaletas 28-30: controle negativo (CN).

Quando utilizado o RNA controle, sintetizado in vitro, na reação convencional, o limiar de detecção da prova ficou em 10^4 cópias de RNA/ μ L, como observa-se na figura 9:

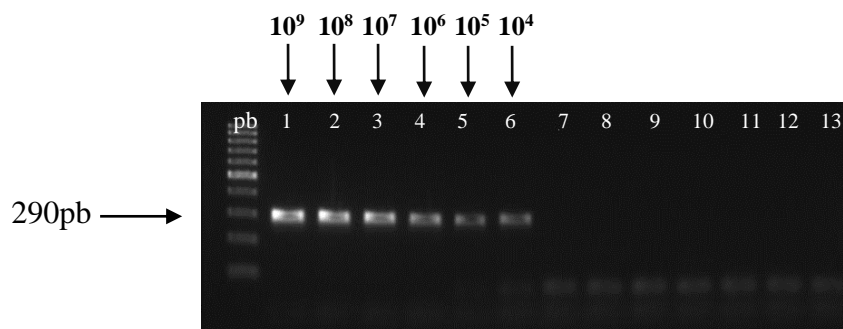


Figura 9 - Gel de eletroforese, com a reação de validação da RT-PCR convencional quando utilizado o RNA controle sintetizado in vitro. pb: DNA ladder de 100 pb (Invitrogen®); canaleta 1 a 12 – diluição seriada na base 10 do RNA controle, iniciando em 10^9 a 10^{-2} ; canaleta 13: controle negativo

5.2. ANÁLISE DAS AMOSTRAS TESTE PELA RT-PCR CONVENCIONAL

Após determinada a sensibilidade analítica da RT-PCR convencional, foram analisados os 172 lotes de SFB, sendo que 70,34% (121/172) das amostras foram positivas, como ilustrado no gráfico 1 (anexo 3).

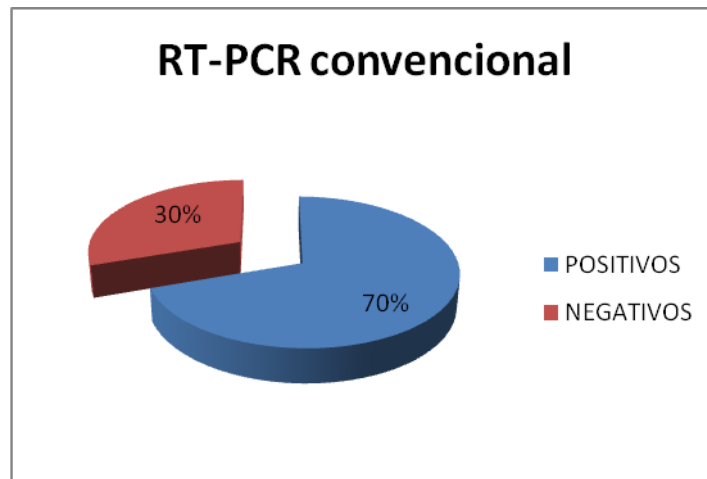


Gráfico 1 - Lotes de SFB submetidos ao teste de RT-PCR convencional

5.3. VALIDAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

Quando feita a qRT-PCR, utilizado o kit comercial da Applied Biosystems™, o software calculou como limiar de detecção da qRT-PCR até 10^1 cópias de RNA/ μ L, como mostra a figura 10 e o quadro 10:

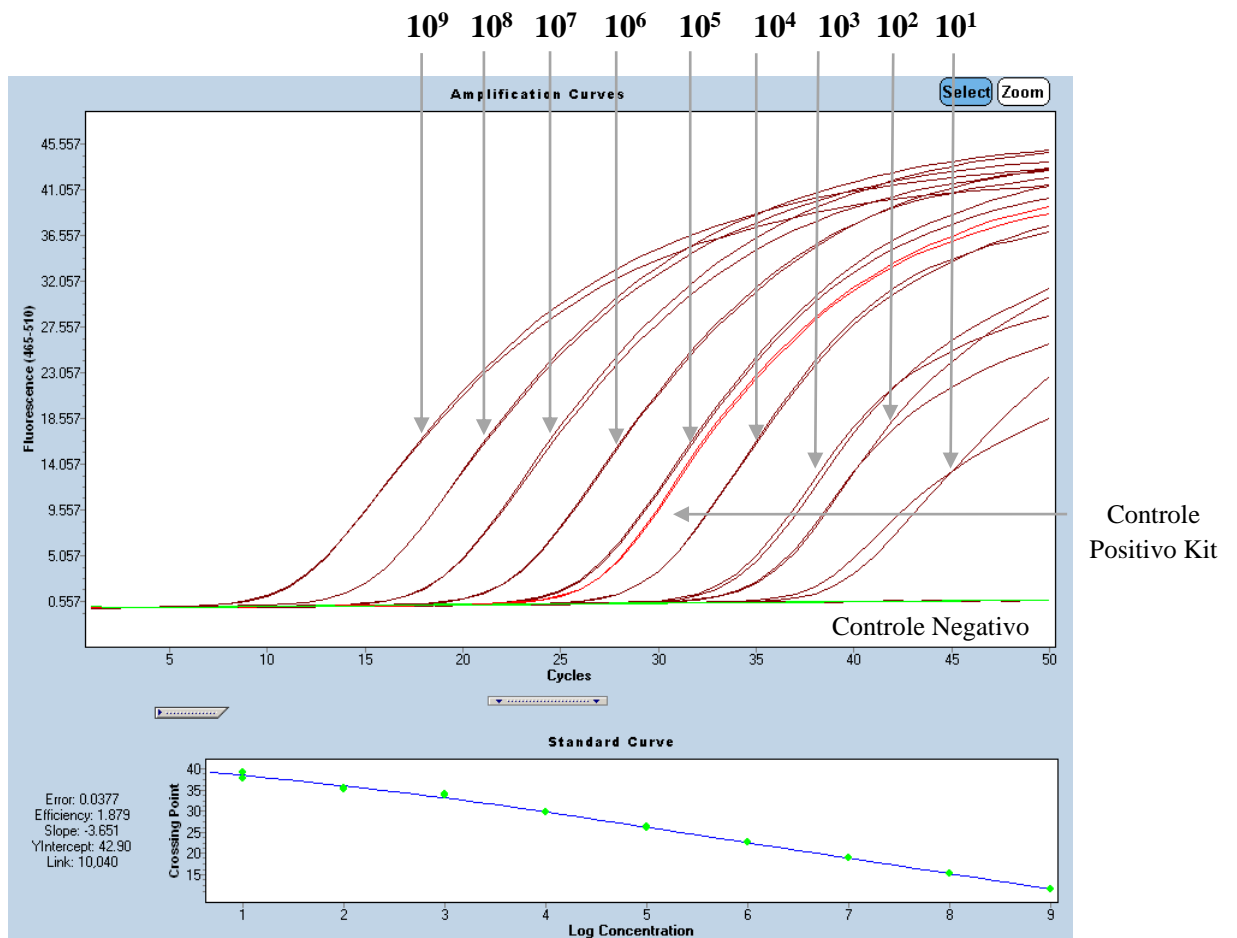


Figura 10 - Curva padrão com o RNA sintético diluído de 10^9 a 10^0 , controle positivo do Kit e controle negativo, controle positivo do Kit e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.00377; Eficiência = 1.879; Slope = -3.651

Quadro 10 – Média do Cp e da concentração das diluições do RNA controle

Cópias de RNA/ μ L	Média Cp	Média da Concentração
10^9	11.51	1.02×10^9
10^8	15.23	9.79×10^7
10^7	18.79	1.04×10^7
10^6	22.55	9.63×10^5
10^5	26.21	9.60×10^4
10^4	29.72	1.05×10^4
10^3	33.88	1.00×10^3
10^2	35.36	1.66×10^2
10^1	38.52	1.14×10^1
Controle Positivo Kit	26.97	5.93×10^4

5.4. SENSIBILIDADE ANALÍTICA DA TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

A sensibilidade analítica do teste, realizada com a contaminação experimental de amostras de SFB ficou com limiar de detecção de 10^{-1} TCID₅₀/50μL para BVDV-1, começando com 10^5 TCID₅₀/50μL (figura 11, quadro 11), embora a curva da diluição 10^{-2} TCID₅₀/50μL tenha apresentado valores de Cp (figura 12, quadro 12), e para BVDV-2 a sensibilidade ficou em 10^{-2} TCID₅₀/50μL como ilustrado na figura 13 e quadro 13:

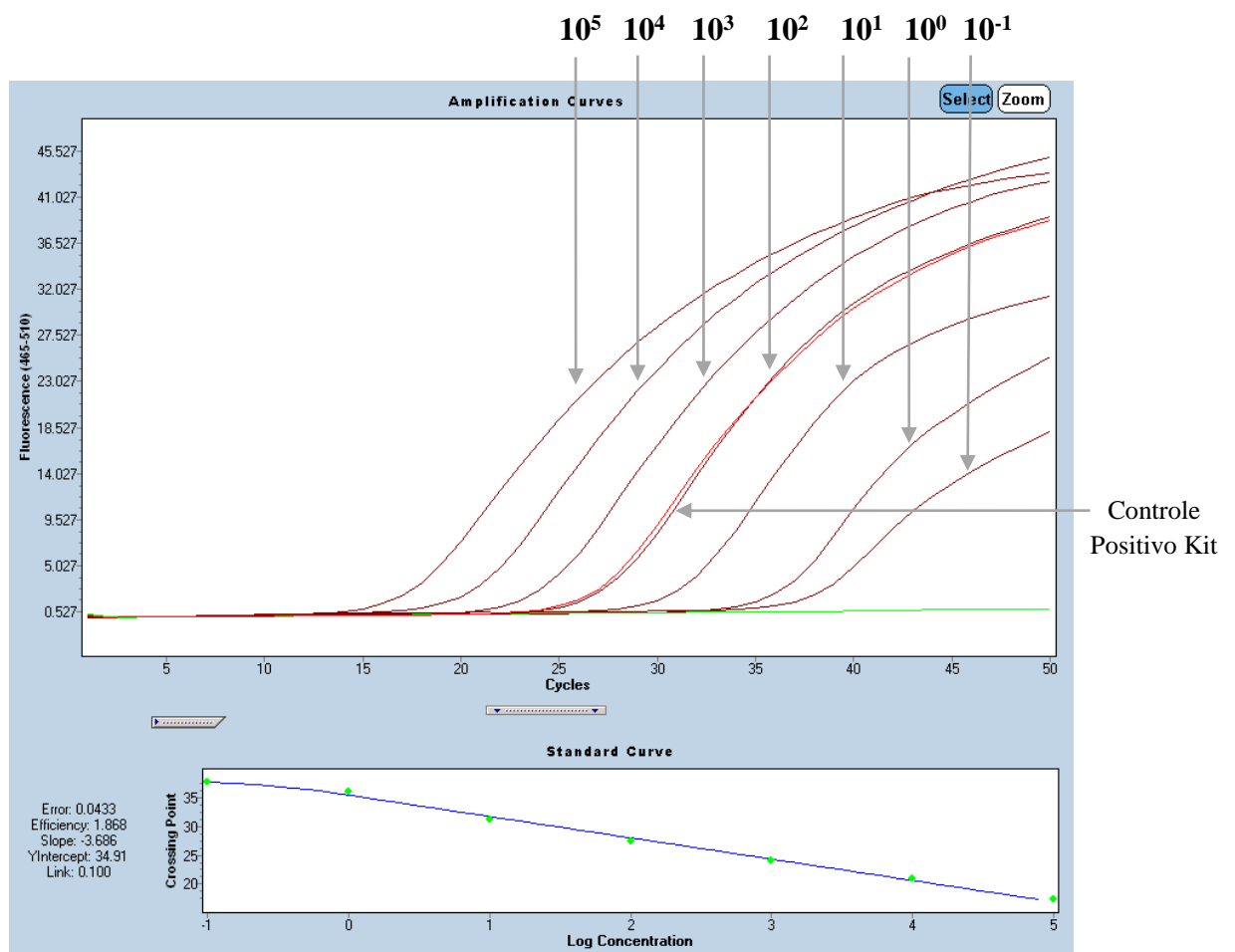


Figura 11 - SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1. Diluições de 10^5 a 10^{-1} TCID₅₀/50μL, controle positivo do Kit com 10^4 cópias de RNA/μL e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.0433; Eficiência = 1.868; Slope = -3.686

Quadro 11 - Média do Cp e da concentração das diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1- 10^5 a 10^{-1} TCID₅₀/50 μ L

TCID ₅₀ /50 μ L	Média Cp	Média da Concentração
10^5	17.37	7.91×10^4
10^4	20.85	8.96×10^3
10^3	24.17	1.13×10^3
10^2	27.43	1.27×10^2
10^1	31.31	1.30×10^1
10^0	36.11	6.51×10^{-1}
10^{-1}	37.73	2.93×10^{-2}

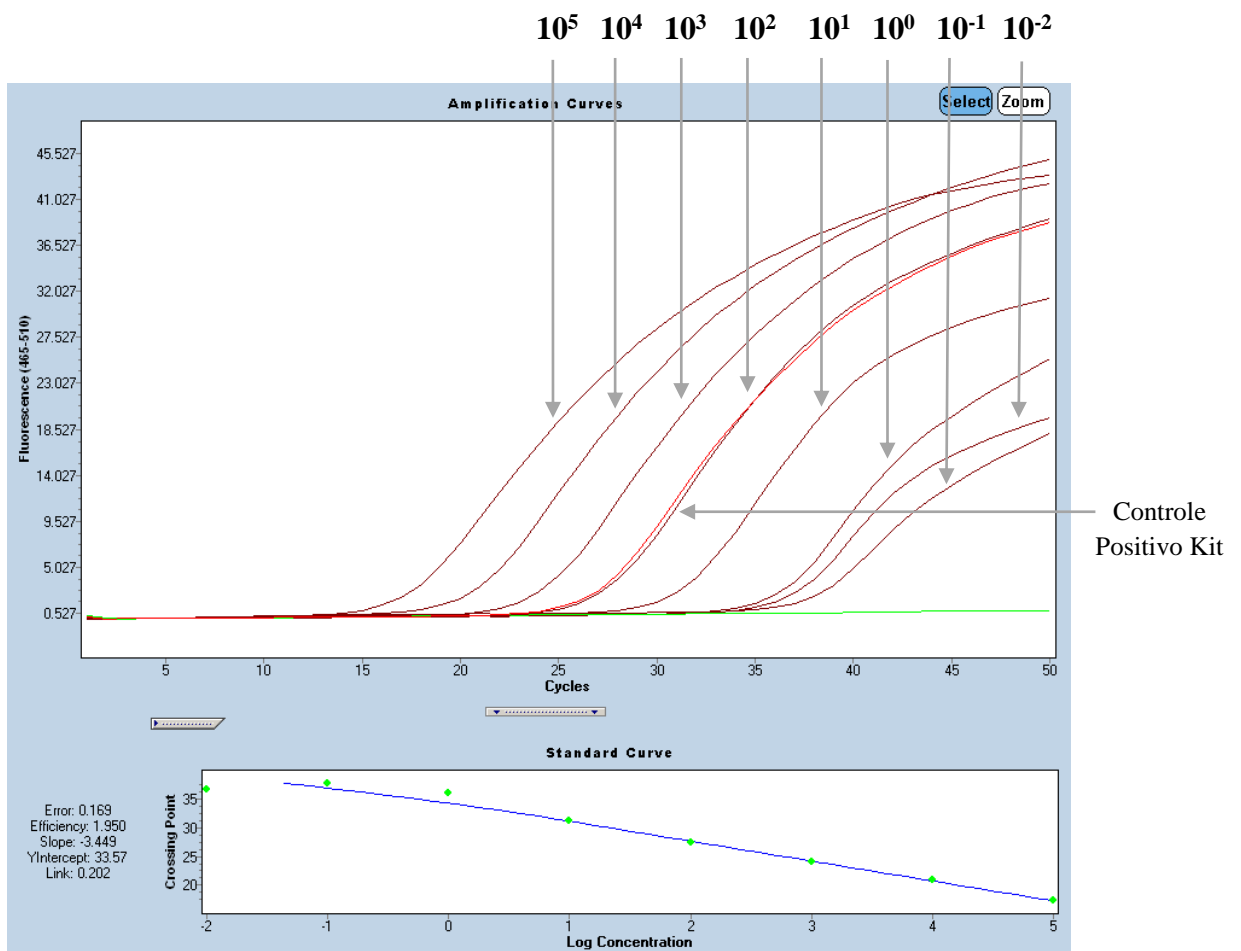


Figura 12 - SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1. Diluições de 10^5 a 10^{-2} TCID₅₀/50 μ L, controle positivo do Kit com 10^4 cópias de RNA/ μ L e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.169; Eficiência = 1.950; Slope = -3.449

Quadro 12 - Média do Cp e da concentração das diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1- 10^5 a 10^{-2} TCID₅₀/50 μ L

TCID ₅₀ /50 μ L	Média Cp	Média da Concentração
10^5	17.37	7.91×10^4
10^4	20.85	8.96×10^3
10^3	24.17	1.13×10^3
10^2	27.43	1.27×10^2
10^1	31.31	1.30×10^1
10^0	36.11	6.51×10^{-1}
10^{-1}	37.73	2.93×10^{-2}
10^{-2}	36.62	1.28×10^{-1}

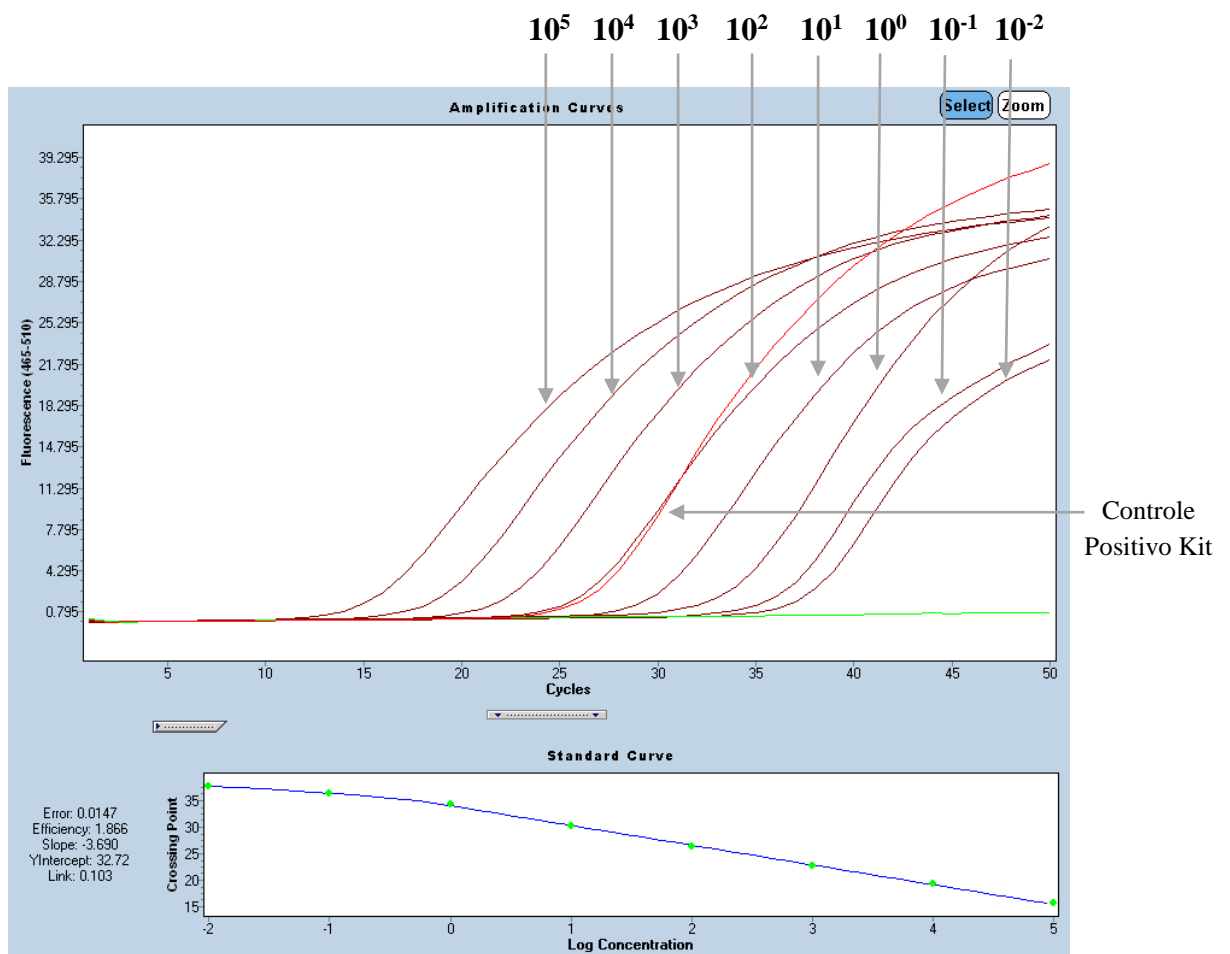


Figura 13 - SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-2. Diluições de 10^5 a 10^{-2} TCID₅₀/50 μ L, controle positivo do Kit com 10^4 cópias de RNA/ μ L e controle negativo. Valores da reação: Erro = 0.0147; Eficiência = 1.866; Slope = -3.690

Quadro 13 - Média do Cp e da concentração das diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-2 - 10^5 a 10^{-2} TCID₅₀/50 μ L

TCID ₅₀ /50 μ L	Média Cp	Média da Concentração
10^5	15.68	8.88×10^4
10^4	19.19	9.96×10^3
10^3	22.75	1.08×10^3
10^2	26.33	1.15×10^2
10^1	30.13	1.08×10^1
10^0	34.21	8.47×10^{-1}
10^{-1}	36.26	1.03×10^{-1}
10^{-2}	37.63	9.90×10^{-3}

Para confirmar se as últimas curvas do gráfico foram específicas, foi feita a corrida de um gel de eletroforese com diluições do RNA controle da reação de qRT-PCR, e o resultado encontrado foi o mesmo da qRT-PCR de 10^1 cópias de RNA/ μ L, ilustrado na figura 14:

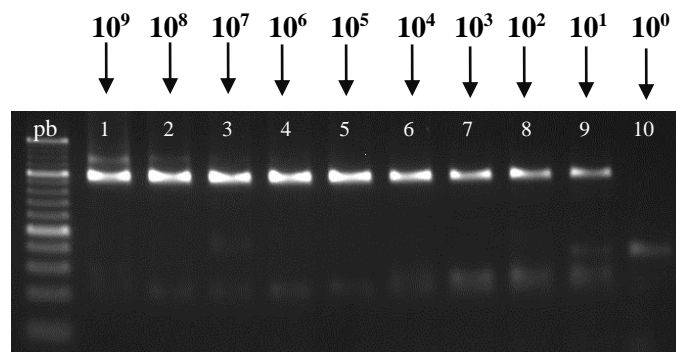


Figura 14 – Gel de eletroforese com diluições do RNA sintético, da reação de qRT-PCR. pb: DNA ladder de 20 pb (Invitrogen®), canaleta 1 a 10: diluição seriada na base 10, de 10^9 cópias de RNA/ μ L a 10^0 cópias de RNA/ μ L.

Quando feito o mesmo com as diluições de SFB contaminado experimentalmente, pela qRT-PCR, o resultado encontrado das últimas diluições está demonstrado na figura 15 para o BVDV-1 e figura 16 para o BVDV-2:

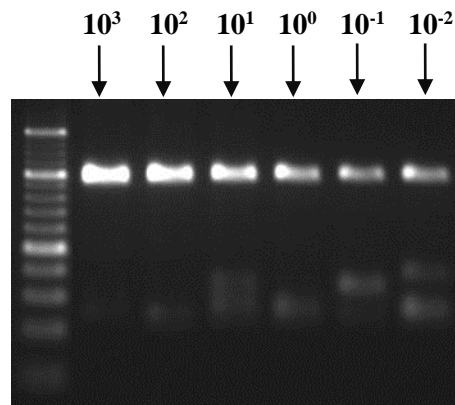


Figura 15 - Gel de eletroforese com diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-1, da reação de qRT-PCR com o kit VetMAX™. pb: DNA ladder de 20 pb (Invitrogen®), canaleta 1 a 10: diluição seriada na base 10, de 10^3 TCID₅₀/50μL a 10^{-2} TCID₅₀/50μL.

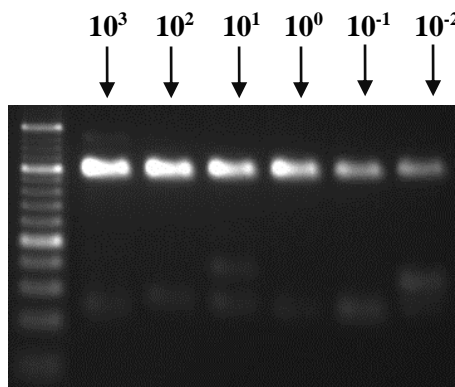


Figura 16 - Gel de eletroforese com diluições do SFB contaminado experimentalmente com o BVDV-2, da reação de qRT-PCR com o kit VetMAX™. pb: DNA ladder de 20 pb (Invitrogen®), canaleta 1 a 10: diluição seriada na base 10, de 10^3 TCID₅₀/50μL a 10^{-2} TCID₅₀/50μL.

5.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS TESTE PELA qRT-PCR

Quando analisados os 172 lotes de SFB pela qRT-PCR, 81,97% (141/172) das amostras foram positivas, como ilustrado no gráfico 2 (anexo 3).

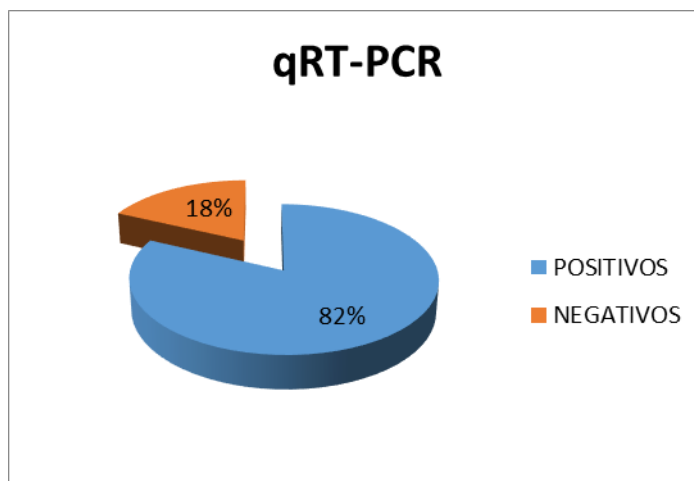


Gráfico 2 - Lotes de SFB submetidos ao teste de RT-PCR em tempo real

Quando as amostras positivas pela qRT-PCR, foram separadas em grupos, dependendo da concentração de vírus que apresentaram, o resultado encontrado revelou que 1% (1/145) das amostras positivas tinham concentração de 10^0 cópias de vírus/ μL , 2% (3/145) estavam com 10^1 cópias de vírus/ μL , 9% (13/145) estavam com 10^2 cópias de vírus/ μL , 29% (42/145) apresentaram 10^3 cópias de vírus/ μL , 49% (71/145), a maioria, obtiveram 10^4 cópias de vírus/ μL e 10% (15/145) tinham 10^5 cópias de vírus/ μL , como mostra a quadro 14 e o gráfico 3. Porém para essa análise foram incluídas 4 amostras, que obtiveram resultado negativo para o teste pois quando feitas em triplicata, somente uma apresentou valores de cp. Isto indica que mesmo sendo amostras consideradas negativas, como estas possuem mínima quantidade de vírus, ficando no ponto de corte da prova (anexo 3), podem ser consideradas como amostras suspeitas.

Quadro 14 - Separação de amostras positivas, pela qRT-PCR, em grupos, de acordo com a concentração de vírus. E0 – E5: amostras com concentração de vírus de 10^0 a 10^5

Concentração da amostra – N° Cópias	Qtde de Amostras	% Amostras
10^0	1	1%
10^1	3	2%
10^2	13	9%
10^3	42	29%
10^4	71	49%
10^5	15	10%
TOTAL	145	100%

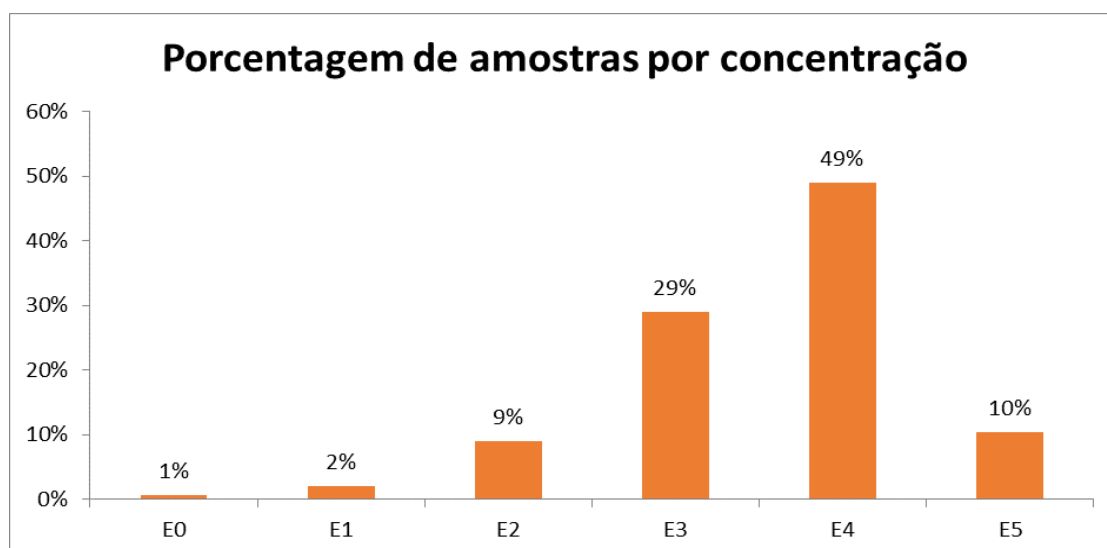


Gráfico 3 – Porcentagem de amostras positivas pela qRT-PCR, separadas em grupos, de acordo com a concentração de vírus. E0 – E5: amostras com concentração de vírus de 10^0 a 10^5

5.6. ELISA ANTÍGENO

Dos 172 lotes de SFB analisados para pesquisa do antígeno da BVDV por ELISA de captura 19,19% (33/172) foram positivas (gráfico 4, anexo 3), tendo como valores de densidade óptica (DO) variando o mínimo de 0,064 para amostra negativa e máximo de 3.288 para amostra positiva (quadro 15). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro em duplo comprimento de onda de 450 nm e 620 nm, sendo considerados animais positivos aqueles cujas amostras apresentaram valores maiores ou iguais a 0,350 ($DO > 0,35$) e animais negativos todos aqueles cujos valores foram menores que 0,350 ($DO < 0,35$).

Quadro 15 - Valores de D.O. considerados positivos das amostras de SFB testadas pelo ELISA Ag

Amostra	D.O.
RAG 05 - 01	1.799
RAG 05 - 86	1.536
RAG 05 - 607	0.661
RAG 05 - 1794	0.355
RAG 05 - 1930	0.886

Amostra	D.O.
RAG 06 - 66	0.350
RAG 06 - 260	0.793
RAG 07 - 51	0.685
RAG 07 - 148	0.675
RAG 07 - 157	0.485
RAG 07 - 192	3.288
RAG 09 - 1397	1.106
RAG 09 - 1677	1.087
RAB 10 - 606	0.382
RAB 10 - 609	4.218
RAB 10 - 610	1.461
RAB 10 - 1066	2.660
RAB 10 - 1324	1.772
RAB 10 - 1395	0.410
LVB/11 - 1366	0.458
LVB/11 - 3555	0.711
LVB/11 - 3556	0.597
LVB/11 - 3557	0.590
LVB/11 - 11897	0.650
LVB/11 - 17204	0.434
LVB/11 - 17910	0.734
LVB/11 - 17911	0.828
LVB/11 - 17912	1.023
LVB/11 - 17913	0.890
LVB/11 - 26849	2.146
LVB/11 - 26853	2.529
LVB/11 - 26856	1.576
LVB/11 - 26881	1.528

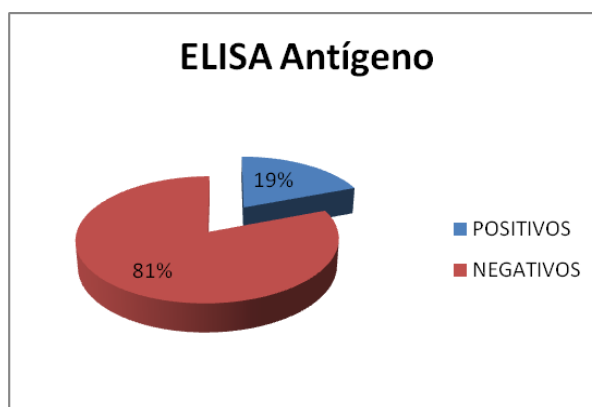


Gráfico 4 - Lotes de SFB submetidos ao teste de Elisa Antígeno

5.7. VIRUSNEUTRALIZAÇÃO

Na virusneutralização, dos 172 lotes analisados, 1,74 % (3/172) apresentaram títulos de anticorpos contra o BVDV-1 (gráfico 5, anexo 3), embora as amostras tenham ficado muito próximas ao ponto de corte da prova (quadro 16), podendo haver variação no resultado de uma reação a outra.

Quadro 16 - Amostras de SFB reagentes ao BVDV testadas na virusnetralização

Amostra	Título
RAG 05 - 1868	20
RAG 08 -1617	40
LVB/11 - 3955	20

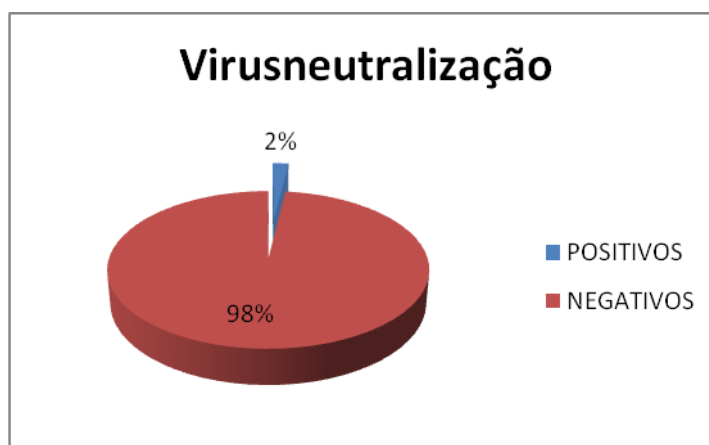


Gráfico 5 - Lotes de SFB submetidos ao teste de Virusneutralização

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando comparados os testes de ELISA_{Ag} e RT-PCR convencional, constatou-se que houve grau insignificante de concordância (0,182) entre os métodos (Tabela 1, Quadro 17).

Tabela 1 - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos lotes de SFB testados pelos métodos de ELISA_{Ag} e RT-PCR convencional

Teste	ELISA +	ELISA -	Total
RT-PCR +	33	88	121
RT-PCR -	0	51	51
Total	33	139	172

Quadro 17 – Margens de valores para classificar o grau de concordância do índice *kappa*

Valores índice <i>kappa</i>	Grau de concordância
< 0	Ausente
0 - 0,2	Insignificante
0,2 - 0,4	Baixo
0,4 - 0,6	Moderado
0,6 - 0,8	Bom
0,8 - 1	Muito bom

Quando comparados os testes de ELISA_{Ag} e qRT-PCR , constatou-se que houve grau insignificante de concordância (0,099) entre os métodos (Tabela 2, Quadro 17).

Tabela 2 - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos lotes de SFB testados pelos métodos de ELISA_{Ag} e qRT-PCR

Teste	ELISA +	ELISA -	Total
qRT-PCR +	33	108	141
qRT-PCR -	0	31	31
Total	33	139	172

E por fim, quando comparados os testes de RT-PCR convencional e qRT-PCR, constatou-se que houve grau bom de concordância (0,686) entre os métodos (Tabela 3, Quadro 17).

Tabela 3 - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos lotes de SFB testados pelos métodos RT-PCR convencional e qRT-PCR

Teste	RT-PCR +	RT-PCR -	Total
qRT-PCR +	121	20	141
qRT-PCR -	0	31	31
Total	121	51	172

5.9. ANÁLISE CUSTO-BENEFÍCIO

Avaliando o quadro de valores percebe-se que o custo fixo mensal dos testes variou 19.5%, sendo o da qRT-PCR mais elevado, por possuir equipamentos mais sofisticados, que por consequência tem maior valor de depreciação, 156,3% a mais, e de certificação, 207% a mais. Além disso a mão de obra operacional necessita ser mais especializada, elevando os custos em 100%, o que ajuda a aumentar os custos desse item.

Já os custos variáveis por exame, composto pelos descartáveis envolvidos no processo, são 17,7% menos onerosos quando realizada a qRT-PCR, pois essa técnica possui uma etapa a menos na reação toda, com isso, a RT-PCR convencional utiliza mais esse tipo de material, o que encarece o seu diagnóstico.

No cenário 1, considerando a capacidade máxima de exames de cada técnica, o gasto para a realização de uma amostra pela RT-PCR convencional é de R\$ 110,21, enquanto que para a mesma análise pela qRT-PCR, o custo é de R\$ 82,07 (quadro 18), revelando que nesse cenário a qRT-PCR é 25,5% mais econômica que a RT-PCR convencional.

Quadro 18 – Cenário 1: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com a capacidade máxima de exames para cada técnica

Custos	RT-PCR	qRT-PCR	Variação (%)
A. Custo fixo (R\$/mês)	R\$ 29.767,79	R\$ 35.562,63	19,5%
A.1. Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	R\$ 1.291,91	R\$ 3.311,51	156,3%
A.2. Certificação	R\$ 374,55	R\$ 1.149,79	207,0%
A.3. Mão de obra operacional	R\$ 3.000,00	R\$ 6.000,00	100,0%
A.4. Mão de obra administrativa	R\$ 23.200,00	R\$ 23.200,00	0,0%
A.5. Água e energia elétrica	R\$ 1.901,32	R\$ 1.901,32	0,0%
B. Custo variável (R\$/mês)	R\$ 56.331,19	R\$ 92.668,58	64,5%
B.1. Custo variável (R\$/exame)	R\$ 56,33	R\$ 46,33	-17,7%
B.2. Número de exames/mês	1.000	2.000	100,0%
C. Custo total (R\$/mês)	R\$ 86.098,98	R\$ 128.231,20	48,9%
B.2. Número de exames/mês	1.000	2.000	100,0%
D. Custo total médio (R\$/exame)	R\$ 86,10	R\$ 64,12	-25,5%
E. 28% - Reserva de gestão IB (25%) + Taxas bancárias (3%)	R\$ 24,11	R\$ 17,95	-25,5%
F. Custo total médio final (R\$/exame)	R\$ 110,21	R\$ 82,07	-25,5%

O custo total mensal é 48,9% maior na qRT-PCR porém esse valor é compensado quando se leva em conta que essa técnica tem o dobro da capacidade de realização de exames em comparação à convencional. Dessa maneira, a qRT-PCR consegue ter menor custo por exame.

Para que as duas técnicas se igualem no custo total mensal é necessário que sejam analisadas, no mínimo, 1.090,69 amostras por mês na qRT-PCR, como apontado no quadro 19 com o cenário 2. Se o número de amostras for menor do que 1.090,69, o custo total mensal volta a ser maior na qRT-PCR:

Quadro 19 - Cenário 2: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com valores iguais para o custo total mensal

Custos	RT-PCR	qRT-PCR	Variação (%)
A. Custo fixo (R\$/mês)	R\$ 29.767,79	R\$ 35.562,63	19,5%
A.1. Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	R\$ 1.291,91	R\$ 3.311,51	156,3%
A.2. Certificação	R\$ 374,55	R\$ 1.149,79	207,0%
A.3. Mão de obra operacional	R\$ 3.000,00	R\$ 6.000,00	100,0%
A.4. Mão de obra administrativa	R\$ 23.200,00	R\$ 23.200,00	0,0%
A.5. Água e energia elétrica	R\$ 1.901,32	R\$ 1.901,32	0,0%
B. Custo variável (R\$/mês)	R\$ 56.331,19	R\$ 50.536,34	-10,3%
B.1. Custo variável (R\$/exame)	R\$ 56,33	R\$ 46,33	-17,7%
B.2. Número de exames/mês	1.000	1.090,69	9,1%
C. Custo total (R\$/mês)	R\$ 86.098,98	R\$ 86.098,97	0,0%
B.2. Número de exames/mês	1.000	1.090,69	9,1%
D. Custo total médio (R\$/exame)	R\$ 86,10	R\$ 78,94	-8,3%
E. 28% - Reserva de gestão IB (25%) + Taxas bancárias (3%)	R\$ 24,11	R\$ 22,10	-8,3%
F. Custo total médio final (R\$/exame)	R\$ 110,21	R\$ 101,04	-8,3%

Em outro cenário, o 3, para que o valor total médio final por amostra, da qRT-PCR, não seja maior do que o valor da RT-PCR convencional, é necessário que sejam feitas, no mínimo 894,3 amostras por mês. Ainda assim, compensará a utilização da qRT-PCR (quadro 20).

Quadro 20 - Cenário 3: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com valores iguais para o custo total médio final da amostra

Custos	RT-PCR	qRT-PCR	Variação (%)
A. Custo fixo (R\$/mês)	R\$ 29.767,79	R\$ 35.562,63	19,5%
A.1. Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	R\$ 1.291,91	R\$ 3.311,51	156,3%
A.2. Certificação	R\$ 374,55	R\$ 1.149,79	207,0%
A.3. Mão de obra operacional	R\$ 3.000,00	R\$ 6.000,00	100,0%
A.4. Mão de obra administrativa	R\$ 23.200,00	R\$ 23.200,00	0,0%
A.5. Água e energia elétrica	R\$ 1.901,32	R\$ 1.901,32	0,0%
B. Custo variável (R\$/mês)	R\$ 56.331,19	R\$ 41.436,75	-26,4%
B.1. Custo variável (R\$/exame)	R\$ 56,33	R\$ 46,33	-17,7%
B.2. Número de exames/mês	1.000	894,3	-10,6%
C. Custo total (R\$/mês)	R\$ 86.098,98	R\$ 76.999,38	-10,6%
B.2. Número de exames/mês	1.000	894,3	-10,6%
D. Custo total médio (R\$/exame)	R\$ 86,10	R\$ 86,10	0,0%
E. 28% - Reserva de gestão IB (25%) + Taxas bancárias (3%)	R\$ 24,11	R\$ 24,11	0,0%
F. Custo total médio final (R\$/exame)	R\$ 110,21	R\$ 110,21	0,0%

E se feita a mesma quantidade de análise, por mês, levando em conta a capacidade máxima da RT-PCR convencional (1.000 exames), o custo por amostra da qRT-PCR fica mais baixo do que pela RT-PCR convencional, como demonstrado no cenário 4 (quadro 21):

Quadro 21 - Cenário 4: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com número igual de amostras por mês

Custos	RT-PCR	qRT-PCR	Variação (%)
A. Custo fixo (R\$/mês)	R\$ 29.767,79	R\$ 35.562,63	19,5%
A.1. Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	R\$ 1.291,91	R\$ 3.311,51	156,3%
A.2. Certificação	R\$ 374,55	R\$ 1.149,79	207,0%
A.3. Mão de obra operacional	R\$ 3.000,00	R\$ 6.000,00	100,0%
A.4. Mão de obra administrativa	R\$ 23.200,00	R\$ 23.200,00	0,0%
A.5. Água e energia elétrica	R\$ 1.901,32	R\$ 1.901,32	0,0%
B. Custo variável (R\$/mês)	R\$ 56.331,19	R\$ 46.334,29	-17,7%
B.1. Custo variável (R\$/exame)	R\$ 56,33	R\$ 46,33	-17,7%
B.2. Número de exames/mês	1.000	1.000	0,0%
C. Custo total (R\$/mês)	R\$ 86.098,98	R\$ 81.896,91	-4,9%
B.2. Número de exames/mês	1.000	1.000	0,0%
D. Custo total médio (R\$/exame)	R\$ 86,10	R\$ 81,90	-4,9%
E. 28% - Reserva de gestão IB (25%) + Taxas bancárias (3%)	R\$ 24,11	R\$ 22,93	-4,9%
F. Custo total médio final (R\$/exame)	R\$ 110,21	R\$ 104,83	-4,9%

Quando feita uma simulação, cenário 5, em que a RT-PCR convencional fosse capaz de analisar mais amostras do que o real, seria necessário que fossem analisadas 3852 amostras por mês para que ela se igualasse ao custo da amostra quando processada pela qRT-PCR em sua capacidade máxima de 2000 amostras por mês (quadro 22).

Quadro 22 - Cenário 5: custos envolvidos na análise de uma amostra pela RT-PCR convencional e qRT-PCR, com maior número de exames por mês pela RT-PCR convencional

Custos	RT-PCR	qRT-PCR	Variação (%)
A. Custo fixo (R\$/mês)	R\$ 29.767,79	R\$ 35.562,63	19,5%
A.1. Depreciação de bens duráveis e semiduráveis	R\$ 1.291,91	R\$ 3.311,51	156,3%
A.2. Certificação	R\$ 374,55	R\$ 1.149,79	207,0%
A.3. Mão de obra operacional	R\$ 3.000,00	R\$ 6.000,00	100,0%
A.4. Mão de obra administrativa	R\$ 23.200,00	R\$ 23.200,00	0,0%
A.5. Água e energia elétrica	R\$ 1.901,32	R\$ 1.901,32	0,0%
B. Custo variável (R\$/mês)	R\$ 216.987,76	R\$ 92.668,58	-57,3%
B.1. Custo variável (R\$/exame)	R\$ 56,33	R\$ 46,33	-17,7%
B.2. Número de exames/mês	3.852	2.000	-48,1%
C. Custo total (R\$/mês)	R\$ 246.755,54	R\$ 128.231,20	-48,0%
B.2. Número de exames/mês	3.852	2.000	-48,1%
D. Custo total médio (R\$/exame)	R\$ 64,06	R\$ 64,12	0,1%
E. 28% - Reserva de gestão IB (25%) + Taxas bancárias (3%)	R\$ 17,94	R\$ 17,95	0,1%
F. Custo total médio final (R\$/exame)	R\$ 82,00	R\$ 82,07	0,1%

6. DISCUSSÃO

O limite de detecção encontrado na RT-PCR convencional mostrou alta sensibilidade analítica do teste, tanto para o BVDV-1 (10^1 TCID₅₀/50µL), como para o BVDV-2 (10^0 TCID₅₀/50µL), embora a qRT-PCR tenha apresentado melhor desempenho, pois obteve sensibilidade analítica de 10^{-1} TCID₅₀/50µL para o BVDV-1 e 10^{-2} TCID₅₀/50µL para o BVDV-2, sendo 100 vezes mais sensível do que o primeiro método citado.

Para a formação da curva padrão da qRT-PCR o limite de detecção foi de 10^1 cópias de RNA/µL, e quando realizada a RT-PCR convencional do RNA sintético, detectou-se até a diluição 10^4 cópias de RNA/µL, indicando que nesse caso a qRT-PCR foi 1000 vezes mais sensível. Isso porque a detecção do DNA amplificado quando utilizada a eletroforese em gel de agarose, com coloração, por exemplo, por brometo de etídio ou gel red, faz com que o acúmulo das fitas de DNA “brilhem” quando expostas a luz ultravioleta, mas o grau de precisão é limitado uma vez que a discriminação é feita pelo tamanho do fragmento em pares de base (pb) (KIDD et al., 2000).

Ficou evidente a necessidade de ajustes constantes para manter a sensibilidade da RT-PCR, uma vez que a mudança de reagentes como, por exemplo, *primers* de uma nova confecção, podem modificar esse cenário, se considerarmos que as temperaturas ideais para a reação podem variar, sendo necessário, portanto, um acompanhamento constante. O que vale também para o controle de RNA, utilizado em todas as provas da qPCR, que facilmente se deteriora com condições de congelamento e descongelamento, ficando evidente a necessidade de troca periódica do mesmo e/ou o fracionamento em pequenas alíquotas, para que sejam utilizadas apenas em uma reação. Além disso, foi possível perceber uma grande diferença entre reações feitas com diferentes marcas de *primers*, chegando à conclusão de que a qualidade da síntese dos mesmos interfere na qualidade da reação. E, ainda, quando os reagentes são adquiridos separadamente, diferente de quando se utiliza um kit comercial padronizado, como é o caso do VetMAX™ da Applied Biosystems™, a estabilidade da reação é prejudicada pela influência que cada reagente tem, como diferenças na temperatura de anelamento entre *primers* e sondas, e na escolha da região viral para desenho dos mesmos, o que prejudica os resultados (dados não mostrados), e necessita de ajustes maiores e mais precisos. O mesmo foi descrito por Nascimento e colaboradores (2012) que ressaltaram que a eficiência das reações de amplificação por RT-PCR e qRT-PCR dependem de diversos fatores, tais como: o cuidado na pipetagem, a qualidade e integridade das amostras (molde de RNA/cDNA e DNA), desenho dos primers, desenho das sondas (quando o sistema utilizado for a TaqMan), condições de termociclagem (temperatura de desnaturação, anelamento dos primers),

qualidade e quantidade dos reagentes e também o tamanho do produto a ser amplificado. Condições específicas para cada experimento devem ser padronizadas (NASCIMENTO et al., 2012).

O kit comercial VetMAX™ da Applied Biosystems™, comprova que a devida padronização torna a reação muito estável em relação às curvas formadas no gráfico do software.

Ainda em relação à qRT-PCR observou-se que as amostras de campo, com quantidade viral muito baixa, 10^1 e 10^0 , possuem concentração muito próxima ao ponto de corte da prova, conseqüentemente não se observa repetibilidade de resultado. Mas quando apresentam valores de cp, o programa gera a concentração, porém informa que estão fora da curva padrão, e, ainda, quando o cp delas é muito alto, maiores que 38, ele indica que o nível de confiança daquele resultado é baixo. Sendo assim há sempre a necessidade de aliar ao resultado emitido pelo software a análise crítica de quem realiza a prova.

Quando comparadas as duas técnicas moleculares, evidenciou-se a vantagem do método quantitativo em relação ao convencional por sua mecanização do processo, que faz diminuir o risco de contaminação entre amostras e também o torna mais ágil, possibilitando, dessa maneira, um aumento no número de amostras testadas em um mesmo período, além da prova ser mais específica devido à utilização da sonda para o fragmento alvo e ainda a leitura é feita através da captação de fluorescência, dispensando procedimentos adicionais como a corrida eletroforética dos produtos em gel de agarose e fotodocumentação (MACKAY et al., 2002), tudo isso aliado a maior sensibilidade analítica encontrada no presente trabalho.

Após determinada a sensibilidade analítica da RT-PCR convencional e validada a curva padrão da qRT-PCR, foram então testados os lotes comerciais de SFB. Na comparação dos dois testes, que identificam os biótipos 1 e 2 do vírus, o resultado demonstrou que as duas técnicas apresentam boa concordância. A qRT-PCR foi 1000 mais sensível, apresentando ponto de corte de 10^1 cópias de RNA/ μ L, enquanto que a RT-PCR convencional apresentou ponto de corte de 10^4 cópias de RNA/ μ L. Esta diferença de sensibilidade aliada a estabilidade do kit comercial explica o número maior de amostras (20) detectadas pela qRT-PCR.

Constatou-se alta frequência de positivos tendo em vista que o lote de SFB é composto por um “pool” de amostras, provenientes de rebanhos endêmicos. Esta positividade poderia ser mais alta considerando-se que o lote é formado por uma mistura de soros de fetos positivos e negativos, sendo que a maior probabilidade é de negativos, ocorrendo uma diluição viral, existindo assim a possibilidade de falso negativo, pois a amostra pode estar abaixo do limiar de detecção dos métodos utilizados. No entanto isso

não significa que o BVDV esteja viável nesse produto que é de grande importância comercial, pois como descrito anteriormente, durante a produção dos lotes ocorre um tratamento por radiação ultravioleta e uma filtragem dos soros, justamente para que possíveis partículas virais sejam inativadas ou eliminadas. Mas, mesmo não sabendo se são partículas virais infecciosas ou não, a alta frequência de lotes positivos revelados pelo método molecular nos mostra a eficiência desse teste em detectar presença, mesmo que em pequenas quantidades, de partículas virais (TAKIUCHI et al., 2005).

Houve melhor desempenho pelas provas moleculares quando comparado com o ELISA_{Ag}, prova disso foi a baixa concordância entre os métodos. Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo fato de que o kit é mais indicado para a análise de tecido de orelha. O próprio fabricante alerta para este fato quando se testa soro, pois os anticorpos presentes podem interferir na prova, gerando falsos negativos. O princípio do ELISA_{Ag} é a captura do antígeno anticorpos monoclonais específicos. Caso haja no soro anticorpos policlonais contra o BVDV, estes podem bloquear a detecção do antígeno, sendo este fato comum para bezerros PI contendo anticorpos colostrais. Isso ocorre também com soro de fetos no terço final da gestação, após o feto já ter desenvolvido sistema imune, pode haver presença simultânea de vírus e anticorpos contra BVDV (MOENNIG, LIESS, 1995; GROOMS, 2006). Dessa maneira, podem ter ocorrido resultados falsos negativos devido a competição com anticorpos presentes no SFB.

Além disso, existe uma diferença na sensibilidade diagnóstica dos testes, pois cada um tem como alvo de identificação uma região diferente do vírus, sendo o ELISA para uma proteína estrutural (E^{ms}) e as moleculares para a região 5'UTR, não traduzida do vírus, o que pode contribuir para a diferença encontrada. Isso também pode explicar o fato de não ter havido correlação entre positividade e carga viral, pois uma amostra com maior carga viral pode não apresentar a região alvo que a técnica identifica, e, ao contrário, amostras com baixas cargas virais podem estar enquadradas na região alvo detectada pelo diagnóstico.

Outra hipótese para a divergência de resultados é que os reagentes utilizados no kit de ELISA_{Ag} não reflitam a nossa realidade, já que o kit comercial utilizado é produzido fora do país, e lembrando que a região alvo conservada do vírus, que é utilizada, pode não ser representativa das cepas circulantes no Brasil, evidenciando a necessidade de validação do teste nas condições brasileiras. Para verificar isso, é necessário que sejam feitos sequenciamentos de amostras detectadas como positivas, e também das não identificadas pelo kit, e alinhamento desses resultados com sequências de vírus provenientes de amostras de campo.

Enquanto todos os laboratórios não fizerem a análise das sequências genômicas dos vírus, é essencial que laboratórios de referência continuem seus esforços na pesquisa

genotípica do vírus para alertarem os outros laboratórios diagnósticos sobre possíveis variantes virais que podem estar sendo perdidas no diagnóstico desta virose (DUBOVI, 2013). A identificação do HoBi-like entre os *pestivirus* é um exemplo da necessidade de vigilância contínua, e da necessidade de desenvolvimento de novos ensaios para detecção de estirpes virais divergentes (SCHIRRMEIER et al., 2004, STÅHL et al., 2007, LIU et al., 2008).

Quando ocorrem infecções de vacas susceptíveis no final da gestação o vírus atinge o feto e o animal nasce portador de anticorpos, podendo estar livre do vírus (GROOMS et al., 2006). Para avaliar a presença de anticorpos nos lotes de SFB foi utilizada a VN. A baixa frequência encontrada indica que houve infecção pré-natal contudo devido ao grande número de fetos (média de 250) utilizados para a composição do lote de SFB, não é possível inferir a frequência de infecção, podendo obter resultados falsos negativos devido à diluição da amostra.

Em relação à análise custo-benefício, o resultado dos cálculos indicou que a RT-PCR em tempo real, além de: (I) ter mais agilidade, (II) maior confiança e chances de acerto, devido a menor manipulação humana, (III) mais específica e mais sensível como demonstrado com resultados desse trabalho, (IV) possibilitar a quantificação da amostra, ainda tem um menor custo por amostra. Esse conjunto de fatores evidencia as vantagens reais dessa técnica.

Para o produtor a oferta desse método só trará benefícios, uma vez que ele conseguirá obter resultados do diagnóstico mais rápido, podendo dessa maneira tomar decisões mais velozes em relação ao seu rebanho e ao animal testado, e, quando preciso, eliminar animais positivos que estariam em contato com animais sadios, perpetuando a doença no rebanho e, ainda, pagará menos pelo teste. Dessa maneira o produtor estará economizando duas vezes, quando ele paga menos pelo exame solicitado e também quando ele elimina o animal doente mais rapidamente evitando as perdas econômicas possíveis se outros animais fossem contaminados.

7. CONCLUSÃO

1. A qRT-PCR foi 1.000 vezes mais sensível em relação a RT-PCR convencional, além disso apresenta a vantagem de ser uma prova quantitativa, mais ágil, mais precisa, de custo menor do que a RT-PCR convencional, o que a torna mais vantajosa para o diagnóstico da Diarreia Viral Bovina.
2. Constatou-se alta frequência de lotes de SFB positivos para BVDV, em todos os métodos realizados, sendo a maior pela qRT-PCR. Mas houve divergência de resultados quando comparou-se ELISA_{Ag} com os métodos moleculares, alertando para a possibilidade da presença de estirpes no Brasil com diferenças significativas em relação às de outros países. Isto indica que deve haver mais estudo com relação às estirpes virais circulantes no Brasil, para que se consiga desenvolver ELISA_{Ag} próprio para a região.
3. A VN não é um método eficiente para apontar infecção fetal, devido à alta diluição do soro, caso haja um feto reagente ao BVDV na composição do lote de SFB.

8. REFERÊNCIAS

- ALFAIA B.T.; BARBOSA A.C.V.C.; CAIXETA S.P.M.B.; ROCHA W.V.; BRITO W.M.E.D. Prevalence and risk factors associated with BVDV infection in adult and non-vaccinated bovines females from Goiás, Brazil. **Virus Reviews and Research**. v. 9, n. 1, p. 127, 2004.
- ANDREWS, A.H.; BLOWEY R.W.; BOYD H.; EDDY R.G. **Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle**. 2ª ed. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, p.853-857, 2004.
- BAKER, J.C. The clinical manifestation of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, United States, v.11, n.3, p.425-445, Nov. 1995.
- BAUERMANN, F.V.; RIDPATH, J.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 25, n. 1, p. 6-15, 2013.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Detection of bovine viral diarrhea virus in formalin fixed paraffin embedded tissue sections by real time RT-PCR (Taqman). **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 25-30, 2003.
- BHUDEVI, B.; WEINSTOCK, D. Fluorogenic RT-PCR assay (TaqMan) for detection and classification of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Microbiology**, v. 83, p. 1-10, 2001.
- BILLINIS, C.; LEONTIDES, L.; AMIRIDIS, G.S.; SPYROU, V.; KOSTOULAS, P.; SOFIA, M. Prevalence of BVDV infection in Greek dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**. N. 72, v. 1, p. 75-79, 2005.
- BOTTON, S.A.; GIL, L.H.V.G.; SILVA, A.M.; FLORES, E.F. WEIBLEN, R.; PITUCO, E.M., ROEHE, P.M.; MOOJEN, V.; WENDELSTEIN, A.C. Caracterização preliminar de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) isoladas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.18, n.2, p. 83-90, 1998.
- BOWERS, R.M.; DHAR, A.K. Effect of template on generating a standard curve for absolute quantification of an RNA virus by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**. v. 25, p. 60-64, 2011.
- BRITO W.M.E.D.; SOUZA W.J.; VIEIRA S.; LINHARES D.C.L.; BARBOSA A.C.V.C.; ALFAIA, B.T. Serological study on bovine viral diarrhea in non vaccinated dairy herds with reproductive disorders from Goiás. **Virus Rev. Res**. v. 7, n. 1, p. 144, 2002.
- BROCK, K.V. Strategies for the control and prevention of bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, United States, v. 20, n. 1, p. 171-180, 2004.
- BROCK, K.V.; GROOMS D.L.; GIVENS M.D. Reproductive Disease and Persistent Infections. In: Goyal SM, Ridpath JF. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 145-156, 2005.

BROCK, K.V.; McCARTY, K.; CHASE, C.C.L.; HARLAND, R. Protection against Fetal Infection with Either Bovine Viral Diarrhea Virus Type 1 or Type 2 Using a Noncytopathic Type 1 Modified-Live Virus Vaccine. **Veterinary Therapeutics**. v. 7, n. 1, p. 27-34, 2006.

BROWNLIE, J. The pathogenesis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Revue Scientifique et Technique (Office International des Epizooties)**. France, v. 9, n. 1, p.24-59, Mar. 1990.

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

CARLTON, W. W.; MCGALVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda, p. 68-70. 1998.

CASAROTTO FILHO, N. **Elaboração de projetos Empresariais: Análise estratégica, estudo de viabilidade e plano de negócio**. 1. ed. São Paulo: Editora Atlas SA, v. 1. p.281. 2009.

CHASE, C.C.L.; ELMOWALID, G.; YOUSIF, A.A.A. The immune response to bovine viral diarrhoea virus: a constantly changing picture. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, United States, v. 20, n. 1, p. 95-114, Mar. 2004.

CHI, J. VANLEEUEWEN J.A.; WEERSINK A.; KEEFE G.P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, p.137-153, 2002.

CHILDS, T.X. Disease in cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. Canada, v. 10, p. 316–319, Nov. 1946.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, cap. 53, p. 539-547, 1992.

CORREA, W.M., ZEZZA NETO, L.; BARROS, H.M.; GOTTSCHALK, A.F. Nota clínico-patológica de uma enfermidade das mucosas em São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 141-151, 1968.

CORTEZ, A. HEINEMANN, M.B, CASTRO, A.M.M.G, SOARES, R.M.,PINTO, A.M.V., ALFIERI, A.A., FLORES,E.F., LEITE, R.C., RICHTZENHAIN, L.J. Genetic characterization of Brazilian bovine viral diarrhoea virus isolates by partial nucleotide sequencing of the 5' UTR region. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 4, p. 211-216, 2006.

DENG, R.; BROCK, K.V. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses. **Nucleic Acids Research**, England, v. 21, n. 8, p. 1949-1957, 1993.

DEREGT, D.; LOEWEN, K.G. Bovine viral diarrhoea virus: Biotypes and disease. **Canadian Journal of Veterinary Research**; v. 36, p. 371-378, 1995.

DUBOVI, E.J. Genetic Diversity and BVD virus. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, England, v. 15, n. 3, p. 155-162, Jul. 1992.

DUBOVI, E.J. Laboratory Diagnosis of Bovine Viral Diarrhoea virus. **Biologicals**, v. 41, n. 1, p. 8-13, Jan. 2013.

EVERMANN, J.F.; BARRINGTON, G. Clinical features. In: GOYAL S.M., RIDPATH J.F. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 105-119, 2005.

FIGUEIREDO H.C.P.; VIEIRA P.R.; LAGE A.P.; LEITE R.C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina a vírus em Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. 21, p. 11-15. 1997

FLORES, E.F. Vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). **Biológico**, São Paulo, v.65, n. 1-2, p. 3-9, 2003.

FLORES, E.F.; RIDPATH, J.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; GIL, L.H.V.G. Phylogenetic analyses of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence for a subgenotype within BVDV-2. **Virus Research**. Netherlands, v. 87, n. 1, p. 51-60. Apr. 2002

FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F.S.F.; ROEHE, P.M.; ALFIERI, A.A.; PITUCO, E.M. A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.25. n.3, p.125-134, Jul. 2005.

FRANCKI, R.I.B.; FAUQUET, C.M.; KNUDSON, D.L.; BROWN, F. Classification and Nomenclature of Viruses, Fifth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. **Archives of Virology**, New York, v. 2, p. 223-427, 1991.

FOURICHON, C, BEAUDEAU, F, BAREILLE, N, SEEGER, H. Quantification of economic losses consecutive to infection of a dairy herd with bovine viral diarrhoea virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 177-181, 2005.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; CONFER, A. W.; SALIKI, J. T.; BURGE, J.L.; PAYTON, M. E. Bovine viral diarrhoea virus antigenic diversity: impact on disease and vaccination programs. **Biologicals**, London, v.31, n. 2, p. 89-95, Jun. 2003.

FULTON, R.W.; BURGE, L.J. Bovine viral diarrhoea virus types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. **Vaccine**, v.19, p. 264-274, 2001.

GIL, L.H.V.G. Sequenciamento, análise filogenética e caracterização de polipeptídeos não-estruturais de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV). 1998. 69 f. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1998.

GOENS, S.D. The evolution of bovine viral diarrhoea: a review. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 43, n.12, p.946-954, dezembro, 2002.

GUNN, G.J.; STOTT, A.W.; HUMPHRY, R.W. Modelling and costing BVD outbreaks in beef herds. **The Veterinary Journal**, v. 167, p. 143-149, 2004.

GUNN, G.J.; SAATKAMP, H.W.; HUMPHRY, R.W.; STOTT, A.W. Assessing economic and social pressure for the control of bovine viral diarrhoea virus. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 149-162, 2005.

GROOMS, D, BAKER, J.C.; AMES, T.R. Doenças causadas pelo vírus da diarreia viral bovina. In: Smith BP. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3ª ed. São Paulo, Brasil: Manole, p. 707-714, 2006.

GROOMS, D.L. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhoea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, v. 66, p. 624-628, 2006.

HALFORD, W.P. The essential prerequisites for quantitative RT-PCR. **Nature Biotechnology**. v. 17, n. 9, p. 835, 1999.

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

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 360-361, 2003.

HOUE, H. Economic impact of BVD infection in dairies. **Biologicals**, v. 31, issue 2, p. 137-143, Jun. 2003.

HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 64, p.89-107, 1999.

HOUE H, LLOYD, J.W., BAKER, J.C. Decision tree analysis of control strategies in Danish dairy herds with outbreaks of mucosal disease. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 21, p. 133-46, 1994.

HORZINEK, M.C. The structure of togaviruses. **Progress in Medical Virology**, v. 16, p. 109-156, 1973.

HOWE, K.S.; HÄSLER, B.; STÄRK, K. D. C. Economic principles for resource allocation decisions at national level to mitigate the effects of disease in farm animal populations. **Epidemiol. Infect.** v. 141, p. 91-101, 2013.

ICTV. **International Committee on taxonomy on viruses**. 2012.

Disponível em < <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012> >. Acesso em 26 de fevereiro de 2013.

JOHNSON, D.W.; MUSCOPLAT, C.C. Immunologic abnormalities in calves with chronic bovine viral diarrhoea. **American Journal of Veterinary Research**. v. 34, n. 9, p. 1139–1141, 1973.

KAHN, C.M. **Manual Merck de Veterinaria**. Vol. 1. 6ª ed. Barcelona, España: Editorial Océano, p. 215-218, 2007.

KAMPA, J.; ALENIUS, S.; EMANUELSON, U.; CHANLUN, A.; AIUMLAMAI, S.; 2008. Bovine herpesvirus type 1 (BHV-1) and bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in dairy herds: self-clearance and the detection of seroconversions against a new atypical pestivirus. **Veterinary journal**, 2008.

KIDD, I.M.; CLARK, D.A.; EMERY, V.C. A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. **Journal of Virological Methods**. v. 87, n. 1-2, p. 177-181, 2000.

KIM, S.G.; ANDERSON, R.R.; YU, J.Z.; ZYLICH, N.C.; KINDE, H.; CARMAN, S.; BENEDICE, D.; DUBOVI, E.J. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhoea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. **Veterinary Microbiology**. v. 136, n. 3-4, p. 209-216, 2009.

KOMURIAN-PRADEL, F.; PARANHOS-BACCALÀ, G.; SODOYER, M.; CHEVALLIER, P.; MANDRAND, B.; LOTTEAU, V.; ANDRÉ P. Quantitation of HCV RNA using real-time PCR and fluorimetry. **Journal of Virological Methods**. v. 95, n. 1-2, p. 111-119, 2001.

LETELLIER, C.; De MEULEMEESTER, B.; LOMBA, M.; MIJTEN, E.; KERKHOFS, P. Detection of BVDV persistently infected animals in Belgium: Evaluation of the strategy Implemented. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 72, n. 1, p. 121-125, 2005.

LIEBLER-TENORIO, E.M. Pathogenesis. In: Goyal SM, Ridpath JF. **Bovine Viral Diarrhoea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1ª ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 121-143, 2005.

LIEBERMAM, H. Infecções por Pestevírus. In: BEER, J. (org.). **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. 1ª ed. São Paulo: Roca, p. 89-93, 1988.

LINDBERG, A.; BROWNLIE, J.; GUNN, G.J.; HOUE, H.; MOENNIG, V.; SAATKAMP, H.W.; SANDVIK, T.; VALLE, P.S. The control of bovine viral diarrhoea virus in Europe: today and in the future. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, France, v. 25, n. 3, p. 961-979, 2006.

LUI, L.; XIA, H; BELÀK, S.; BAULE, C. A TaqMan real-time RT-PCR assay for selective detection of atypical bovine pestiviruses in clinical samples and biological products. **Journal of Virological Methods**. v. 154, n. 1-2, p. 82-85, 2008.

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

MALMQUIST, W.A. Bovine viral diarrhea-mucosal disease: Etiology, pathogenesis, and applied immunity. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 152, n. 6, p. 763–768, 1968.

MCCLURKIN, A.W.; LITLEDIKE, E.T.; CUTLIP, R.C.; FRANK, G.H.; CORIA, M.F.; BOLIN, S.R. Production of cattle immunotolerant to bovine viral diarrhea virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**. v. 48, n. 2, p. 156–161, 1984.

MÉDICI K.C.; MOSCARDI JR. E.; VICENTE K.; ALFIERI A.F.; ALFIERI A.A. Identification of antibodies against bovine virus diarrhea virus in beef and dairy cattle herds in Parana State. **Virus Reviews and Research**. v. 5, n.1, p.145, 2000.

MELO C.B.; OLIVEIRA A.M.; FIGUEIREDO H.C.P.; LEITE R.C.; LOBATO Z.I.P. Prevalência de anticorpos contra o Herpesvirus Bovino-1, vírus da diarréia viral bovina e vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos do Estado do Sergipe, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p.160-161. 1997.

MOENNIG, V.; LIESS, B. Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.11, p. 477-487, 1995.

MOENNIG, V. & PLAGEMANN, P.G.W. **The pestiviruses**. Advances Virus Research, Academic Press, v.41, p.53-98, 1992.

MOENNIG, V. Pestiviruses: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p.35-54,1990.

MORRISON, T.M.; WEIS, J.J.; WITWER, C.T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I Monitoring during amplification. **Biotechniques**. v. 24, p. 954-962, 1998.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E.R.; PINHAL, M.A.S. Tecnologia da PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 67, n. 10, p. 7 -19, 2012.

NORONHA R.; CAMPOS S.G.; SARDI S. Serum neutralization test and viral isolation for bovine viral diarrhea virus in the state of Bahia. **Virus Reviews and Research**. v. 6, n.1, p.146, 2001.

OIE – World Organization for Animal Health. Chapter 2.4.8. – Bovine Viral Diarrhoea. In: **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, p. 698-711, 2008.

Disponível em

< http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.08_BVD.pdf>. Acesso em 14 de fevereiro de 2013.

OLAFSON, P.; MacCALLUM, A. D.; FOX, F. H. An apparently new transmissible disease of cattle. **Cornell Veterinarian**. v.36, p. 205-213, 1946.

PELLERIN, C.; VAN DEN HURK, J.; LECOMTE, J. Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. **Virology**, United States, v. 203, p. 260-268, Sep. 1994.

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

PLANT, J.W, LITTLEJOHNS, I.E, GARDINER, A.C, et al. Immunological relationship between border disease, mucosal disease and swine fever. **Veterinary Research**, v. 92, n. 17, p. 455, 1973.

PITUCO, E.M.; DEL FAVA, C. Situação do BVDV na América do Sul. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HERPESVÍRUS BOVINO (TIPO 1 E 5) E VÍRUS DA DIARRÉIA VIRAL BOVINA (BVDV), 1998, Santa Maria, **Anais...** UFSM, Rio grande do Sul, p.49-57, 1998.

PITUCO, E.M.; DEL FAVA, C.; OKUDA, L.H. 1997. Prevalência da infecção pelo vírus da Diarreia bovina a vírus em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Vale do Ribeira, SP, Brasil. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 1. p. 23-28, 1997.

POWLEDGE, T.M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**. v. 28, n. 2, p. 44–50, 2004.

PRITCHARD, G.; BORLAND, E.D.; WOOD, L.; PRITCHARD, D.G. Severe disease in a dairy herd associated with acute infection with bovine virus diarrhoea virus, *Leptospira hardjo* and *Coxiella burnetii*. **Veterinary Research**, v. 124, p. 625–629, 1989.

QUINCOZES, C.G. Prevalência e fatores de risco associados às infecções pelos Herpesvírus bovino tipo 1 e 5 (BHV-1 e 5) e pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) nos rebanhos dos municípios de Santa Vitória do Palmar e Chuí. 2005. 103p. Dissertação (**Mestrado**). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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^a ed. London, UK: W. B. Saunders, p. 1085-1105, 2000.

RAMSEY, F.; CHIVERS, W. Mucosal disease of cattle. **North American Veterinary**, v. 34, p. 629-633, 1953.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493–497, 1938.

RICHTZENHAIN L.J.; BARBARINI J.R.; UMEHARA O.; DE GRACIA A.S.; CORTEZ A.; HEINEMANN M.B.; FERREIRA F.; SOARES R.M. Diarreia viral bovina: levantamento sorológico nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 66, n.1, p.107-111, 1999.

RIDPATH, J.F.; NEILL, J.D.; FREY, M.; LANDGRAF, J.G. Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 77, n. 1-2, p. 145-155, Nov. 2000.

RIDPATH, J. F. Classification and molecular biology. In: GOYAL, S. M.; RIDPATH, J. F. **Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management and control**. Iowa: Blackwell Publishing, 1^a ed., cap. 3, p. 65-80, 2005.

RIDPATH, J.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F (org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, cap. 22, p. 564-591, 2007.

ROBERT, A.; BEAUDEAU, F.; SEEGER, H.; JOLY, A.; PHILIPOT, J.M. Large scale assessment of the effect associated with bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy cows in 6149 dairy herds in Brittany (Western France). **Theriogenology**. V. 61, n. 1, p.117–127, 2004

SANDVIK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. **Veterinary Microbiology**, Netherlands, v. 64, n. 2-3, p. 123 – 134, 1999.

SCHIRMEIER, H.; STREBELOW, G.; DEPNER, K.; HOFFMANN, B.; BEER, M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. **The Journal of General Virology**, England, v. 85, p. 3647–3652, Dec. 2004.

SCHUCH, L.F.D. Diarréia Viral Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; LEMOS, R.A.A. (org.). **Doenças de ruminantes e equinos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria, v. 1, p.64-71, 2006.

STÅHL, K., KAMPA, J., ALENIUS, S., PERSSON WADMAN, A., BAULE, C., AIUMLAMAI, S., BELÁK, S. Natural infection of cattle with an atypical 'HoBi'- like pestivirus -implications for BVD control and for the safety of biological products. **Veterinary Research**, v. 38, p. 517–523, 2007.

STALDER, H.P.; MEIER, P.; PFAFFEN, G.; WAGECK-CANAL, C.; RUFENACHT, J.; SCHALLER, P.; BACHOFEN, C.; MARTI, S.; VOGT, H.R.; PETERHANS, E. Genetic heterogeneity of pestiviruses of ruminants in Switzerland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 72, p. 37–41, 2005.

TAGIMA ,M.; DUBOVI, E.J. Genetic and clinical analyses of bovine viral diarrhoea virus isolates from dairy operations in the United States of America. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, United States, v. 17, n. 1, p. 10-15, 2005.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. **Research in Veterinary Science**, London, v.79, n.1, p 85-88, 2005.

THURMOND, M.C. Virus Transmission. In: Goyal SM, Ridpath JF. **Bovine Viral Diarrhea Virus: Diagnosis, Management and Control**. 1^a ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, p. 91-104, 2005.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**. v. 29, n. 3, p. 151–159, 2005.

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

VILCEK, S.; DURKOVIC, B.; KOLESAROVA, M.; GREISER-WILKE, I.; PATON, D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: identification of a new BVDV-1 genetic group. **Veterinary Research**, France, v. 3, n. 5, p. 609-615, Sep-Oct. 2004.

WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; CASTRO, A.E. Single-Tube Single-Enzyme Reverse transcriptase PCR assay for detection of Bovine Viral Diarrhea virus in pooled bovine serum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 343-346, Jan. 2001.


WHITCOMBE, D.; THEAKER, J.; GUY, S.P.; BROWN, T.; LITTLE, S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. **Nature Biotechnology**. v. 17, n. 8, p. 804-807, 1999.

WIZIGMANN, G.; VIDOR, T. & RICCI, Z.M.T. Investigações sorológicas sobre a ocorrência e incidência dos vírus PI-3, IBR e diarreia a vírus enfermidade das mucosas no Estado do Rio Grande do Sul. **Boletim do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor**, Porto Alegre, v. 1, p. 52-58, 1971.

YAN,L.; ZHANG, S.; PACE, L.; WILSON, F.; WAN, H.; ZHANG, M. Combination of reverse transcription real-time polymerase chain reaction and antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of animals persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 16-25, 2011.

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Comissão de ética (frente)



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

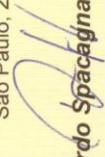
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

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 - Comissão de ética (verso)

CETEA - IB

Registro

Número : 59/08

Livro : 01

Folha : 59

Data: 22/08/12

ANEXO 3 – Quadro com os dados individuais das amostras de SFB testadas por RT-PCR convencional, qRT-PCR, ELISA Ag e Virusneutralização do experimento

AMOSTRA N°	RT-PCR		qRT-PCR		ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
RAG 05 - 01	POS	POS	25.63	2.42 x 10 ⁵	1.799	POS	NR
RAG 05 - 86	POS	POS	28.30	4.34 x 10 ⁴	1.536	POS	NR
RAG 05 - 590	POS	POS	29.58	1.87 x 10 ⁴	0.145	NEG	NR
RAG 05 - 607	POS	POS	29.22	2.38 x 10 ⁴	0.661	POS	NR
RAG 05 - 1020	POS	POS	28.21	4.60 x 10 ⁴	0.110	NEG	NR
RAG 05 - 1794	POS	POS	26.40	1.48 x 10 ⁵	0.355	POS	NR
RAG 05 - 1842	POS	POS	27.92	5.57 x 10 ⁴	0.213	NEG	NR
RAG 05 - 1843	POS	POS	26.87	1.10 x 10 ⁵	0.155	NEG	NR
RAG 05 - 1852	POS	POS	28.68	3.38 x 10 ⁴	0.160	NEG	NR
RAG 05 - 1853	POS	POS	28.83	3.07 x 10 ⁴	0.258	NEG	NR
RAG 05 - 1868	POS	POS	29.64	1.81 x 10 ⁴	0.095	NEG	20
RAG 05 - 1869	POS	POS	30.64	9.29 x 10 ³	0.110	NEG	NR
RAG 05 - 1875	POS	POS	30.77	8.54 x 10 ³	0.185	NEG	NR
RAG 05 -1930	POS	POS	30.54	9.95 x 10 ³	0.886	POS	NR
RAG 05 - 1938	POS	POS	27.12	9.36 x 10 ⁴	0.175	NEG	NR
RAG 06 - 66	POS	POS	29.52	1.95 x 10 ⁴	0.350	POS	NR
RAG 06 - 68	POS	POS	28.86	3.01 x 10 ⁴	0.250	NEG	NR
RAG 06 - 153	POS	POS	29.94	1.48 x 10 ⁴	0.218	NEG	NR
RAG 06 - 200	NEG	POS	30.09	1.34 x 10 ⁴	0.081	NEG	NR
RAG 06 - 250	NEG	POS	31.50	5.21 x 10 ³	0.114	NEG	NR
RAG 06 - 251	POS	POS	29.49	1.98 x 10 ⁴	0.160	NEG	NR
RAG 06 - 252	POS	POS	30.62	9.39 x 10 ³	0.094	NEG	NR
RAG 06 - 253	POS	POS	29.84	1.58 x 10 ⁴	0.152	NEG	NR

AMOSTRA N°	RT-PCR	qRT-PCR			ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
RAG 06 - 254	POS	POS	29.97	1.45 x 10 ⁴	0.215	NEG	NR
RAG 06 - 255	POS	POS	31.00	7.31 x 10 ³	0.088	NEG	NR
RAG 06 - 256	POS	POS	28.33	4.26 x 10 ⁴	0.121	NEG	NR
RAG 06 - 257	POS	POS	29.02	2.70 x 10 ⁴	0.142	NEG	NR
RAG 06 - 258	NEG	POS	34.50	6.77 x 10 ²	0.097	NEG	NR
RAG 06 - 260	POS	POS	29.62	1.83 x 10 ⁴	0.793	POS	NR
RAG 07 - 51	POS	POS	30.30	1.16 x 10 ⁴	0.685	POS	NR
RAG 07 - 52	POS	POS	29.90	1.52 x 10 ⁴	0.108	NEG	NR
RAG 07 - 53	POS	POS	28.80	3.13 x 10 ⁴	0.129	NEG	NR
RAG 07 - 54	POS	POS	29.26	2.31 x 10 ⁴	0.072	NEG	NR
RAG 07 - 55	POS	POS	26.96	1.03 x 10 ⁵	0.136	NEG	NR
RAG 07 - 56	NEG	POS	30.65	1.37 x 10 ⁴	0.087	NEG	NR
RAG 07 - 57	POS	POS	29.59	2.83 x 10 ⁴	0.129	NEG	NR
RAG 07 - 111	POS	POS	28.86	4.55 x 10 ⁴	0.141	NEG	NR
RAG 07 - 146	POS	POS	27.18	1.27 x 10 ⁵	0.081	NEG	NR
RAG 07 - 148	POS	POS	29.27	3.48 x 10 ⁴	0.675	POS	NR
RAG 07 - 157	POS	POS	29.35	3.32 x 10 ⁴	0.485	POS	NR
RAG 07 - 192	POS	POS	28.54	5.58 x 10 ⁴	3.288	POS	NR
RAG 07 - 851	POS	POS	29.14	4.38 x 10 ⁴	0.130	NEG	NR
RAG 07 - 858	NEG	POS	29.18	4.27 x 10 ⁴	0.094	NEG	NR
RAG 07 - 859	POS	POS	28.77	4.83 x 10 ⁴	0.151	NEG	NR
RAG 08 -1616	POS	POS	28.72	4.98 x 10 ⁴	0.101	NEG	NR
RAG 08 -1617	POS	POS	27.91	8.23 x 10 ⁴	0.067	NEG	40
RAG 08 -1678	POS	POS	28.54	5.56 x 10 ⁴	0.242	NEG	NR
RAG 08 -1688	POS	POS	28.59	5.39 x 10 ⁴	0.127	NEG	NR
RAG 09 - 1355	POS	POS	28.58	5.43 x 10 ⁴	0.099	NEG	NR

AMOSTRA N°	RT-PCR	qRT-PCR			ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
RAG 09 - 1357	POS	POS	28.79	4.76 x 10 ⁴	0.104	NEG	NR
RAG 09 - 1397	POS	POS	26.50	1.91 x 10 ⁵	1.106	POS	NR
RAG 09 - 1677	POS	POS	26.54	1.85 x 10 ⁵	1.087	POS	NR
RAB 10 - 606	POS	POS	2784	8.60 x 10 ⁴	0.382	POS	NR
RAB 10 - 609	POS	POS	24.99	4.63 x 10 ⁵	4.218	POS	NR
RAB 10 - 610	POS	POS	25.62	3.20 x 10 ⁵	1.461	POS	NR
RAB 10 - 656	POS	POS	31.09	1.01 x 10 ⁴	0.185	NEG	NR
RAB 10 - 657	POS	POS	27.34	1.16 x 10 ⁵	0.207	NEG	NR
RAB 10 - 1066	POS	POS	25.51	3.41 x 10 ⁵	2.660	POS	NR
RAB 10 - 1164	POS	POS	32.18	4.54 x 10 ³	0.182	NEG	NR
RAB 10 - 1324	POS	POS	25.68	3.08 x 10 ⁵	1.772	POS	NR
RAB 10 - 1344	POS	POS	34.69	6.29 x 10 ²	0.141	NEG	NR
RAB 10 - 1393	NEG	NEG	-	-	0.073	NEG	NR
RAB 10 - 1395	POS	POS	29.64	2.74 x 10 ⁴	0.410	POS	NR
RAB 10 - 1603	POS	POS	27.37	1.14 x 10 ⁵	0.330	NEG	NR
RAB 10 - 1604	POS	POS	28.36	6.24 x 10 ⁴	0.156	NEG	NR
RAB 10 - 1605	POS	POS	27.54	1.03 x 10 ⁵	0.157	NEG	NR
RAB 10 - 1606	POS	POS	27.34	1.16 x 10 ⁵	0.102	NEG	NR
RAB 10 - 1607	NEG	NEG	-	-	0.090	NEG	NR
LVB/11 - 1366	POS	POS	27.95	2.76 x 10 ⁴	0.458	POS	NR
LVB/11 - 1573	POS	POS	28.78	1.61 x 10 ⁴	0.131	NEG	NR
LVB/11 - 3555	POS	POS	28.31	2.18 x 10 ⁴	0.711	POS	NR
LVB/11 - 3556	POS	POS	29.60	1.18 x 10 ⁴	0.597	POS	NR
LVB/11 - 3557	POS	POS	29.58	9.56 x 10 ³	0.590	POS	NR
LVB/11 - 3955	POS	POS	32.32	1.62 x 10 ³	0.084	NEG	20
LVB/11 - 4863	POS	POS	31.06	3.66 x 10 ³	0.067	NEG	NR

AMOSTRA N°	RT-PCR	qRT-PCR			ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
LVB/11 - 4922	POS	POS	29.44	1.05 x 10 ⁴	0.095	NEG	NR
LVB/11 - 4923	POS	POS	29.11	1.30 x 10 ⁴	0.151	NEG	NR
LVB/11 - 7309	NEG	POS	29.60	9.45 x 10 ³	0.115	NEG	NR
LVB/11 - 7310	POS	POS	30.83	4.26 x 10 ³	0.115	NEG	NR
LVB/11 - 9094	POS	POS	30.86	4.17 x 10 ³	0.116	NEG	NR
LVB/11 - 9949	NEG	POS	30.84	4.23 x 10 ³	0.117	NEG	NR
LVB/11 - 9951	POS	POS	30.88	4.11 x 10 ³	0.107	NEG	NR
LVB/11 - 10155	NEG	POS	34.54	3.75 x 10 ²	0.101	NEG	NR
LVB/11 - 11897	POS	POS	28.90	1.49 x 10 ⁴	0.650	POS	NR
LVB/11 - 12915	NEG	POS	35.79	1.70 x 10 ²	0.099	NEG	NR
LVB/11 - 12927	NEG	POS	34.33	4.39 x 10 ²	0.125	NEG	NR
LVB/11 - 12928	POS	POS	31.59	2.59 x 10 ³	0.108	NEG	NR
LVB/11 - 17204	POS	POS	27.18	4.56 x 10 ⁴	0.434	POS	NR
LVB/11 - 17858	POS	POS	29.66	9.08 x 10 ³	0.099	NEG	NR
LVB/11 - 17910	POS	POS	30.70	4.62 x 10 ³	0.734	POS	NR
LVB/11 - 17911	POS	POS	31.03	3.72 x 10 ³	0.828	POS	NR
LVB/11 - 17912	POS	POS	28.75	1.64 x 10 ⁴	1.023	POS	NR
LVB/11 - 17913	POS	POS	32.79	1.19 x 10 ³	0.890	POS	NR
LVB/11 - 20104	POS	POS	31.08	3.62 x 10 ³	0.121	NEG	NR
LVB/11 - 21977	POS	POS	31.70	2.40 x 10 ³	0.083	NEG	NR
LVB/11 - 21978	POS	POS	31.69	2.43 x 10 ³	0.088	NEG	NR
LVB/11 - 21979	NEG	POS	34.14	4.95 x 10 ²	0.090	NEG	NR
LVB/11 - 24875	NEG	POS	32.76	1.21 x 10 ³	0.144	NEG	NR
LVB/11 - 25412	POS	POS	31.22	3.31 x 10 ³	0.104	NEG	NR
LVB/11 - 26766	POS	POS	31.96	2.05 x 10 ³	0.125	NEG	NR
LVB/11 - 26849	POS	POS	29.35	1.11 x 10 ⁴	2.146	POS	NR

AMOSTRA N°	RT-PCR	qRT-PCR			ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
LVB/11 - 26850	NEG	NEG	-	-	0.096	NEG	NR
LVB/11 - 26851	NEG	NEG	-	-	0.088	NEG	NR
LVB/11 - 26852	NEG	NEG	-	-	0.085	NEG	NR
LVB/11 - 26853	POS	POS	26.83	6.28 x 10 ⁴	2.529	POS	NR
LVB/11 - 26854	NEG	NEG	-	-	0.092	NEG	NR
LVB/11 - 26855	NEG	NEG	-	-	0.091	NEG	NR
LVB/11 - 26856	POS	POS	30.20	7.60 x 10 ³	1.576	POS	NR
LVB/11 - 26857	NEG	POS	37.35	1.25 x 10 ³	0.098	NEG	NR
LVB/11 - 26858	NEG	NEG	-	-	0.112	NEG	NR
LVB/11 - 26859	NEG	NEG	-	-	0.130	NEG	NR
LVB/11 - 26860	NEG	NEG	-	-	0.117	NEG	NR
LVB/11 - 26861	NEG	NEG	-	-	0.096	NEG	NR
LVB/11 - 26862	NEG	NEG	-	-	0.091	NEG	NR
LVB/11 - 26863	NEG	NEG	-	-	0.103	NEG	NR
LVB/11 - 26864	NEG	POS	35.90	2.65 x 10 ²	0.106	NEG	NR
LVB/11 - 26865	NEG	NEG	-	-	0.112	NEG	NR
LVB/11 - 26866	NEG	NEG	-	-	0.126	NEG	NR
LVB/11 - 26867	NEG	NEG	-	-	0.138	NEG	NR
LVB/11 - 26868	NEG	NEG	-	-	0.103	NEG	NR
LVB/11 - 26869	NEG	NEG	-	-	0.097	NEG	NR
LVB/11 - 26870	NEG	NEG	-	-	0.090	NEG	NR
LVB/11 - 26871	NEG	NEG	-	-	0.097	NEG	NR
LVB/11 - 26872	NEG	NEG	-	-	0.112	NEG	NR
LVB/11 - 26873	NEG	POS	38.27	7.20 x 10 ¹	0.122	NEG	NR
LVB/11 - 26874	NEG	NEG	-	-	0.104	NEG	NR
LVB/11 - 26875	NEG	NEG	-	-	0.116	NEG	NR

AMOSTRA N°	RT-PCR	qRT-PCR			ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
LVB/11 - 26876	NEG	NEG	-	-	0.131	NEG	NR
LVB/11 - 26877	NEG	NEG	-	-	0.142	NEG	NR
LVB/11 - 26878	NEG	NEG	-	-	0.130	NEG	NR
LVB/11 - 26879	NEG	POS	37.55	1.06 x 10 ²	0.126	NEG	NR
LVB/11 - 26880	NEG	NEG	-	-	0.110	NEG	NR
LVB/11 - 26881	POS	POS	27.47	4.14 x 10 ⁴	1.528	POS	NR
LVB/11 - 26882	NEG	NEG	-	-	0.102	NEG	NR
LVB/11 - 26883	NEG	NEG	-	-	0.110	NEG	NR
LVB/11 - 27196	POS	POS	33.04	1.38 x 10 ³	0.356	NEG	NR
LVB/11 - 27197	NEG	POS	36.54	2.97 x 10 ²	0.127	NEG	NR
LVB/11 - 29884	POS	POS	31.17	4.35 x 10 ³	0.115	NEG	NR
LVB/11 - 30659	NEG	POS	37.33	2.23 x 10 ²	0.185	NEG	NR
LVB/11 - 32050	POS	POS	27.95	3.20 x 10 ⁴	0.107	NEG	NR
LVB/11 - 33406	POS	POS	29.51	1.19 x 10 ⁴	0.261	NEG	NR
LVB/11 - 33407	POS	POS	32.55	2.01 x 10 ³	0.225	NEG	NR
LVB/11 - 33112	POS	POS	32.91	1.94 x 10 ³	0.108	NEG	NR
LVB/11 - 33113	POS	POS	32.05	2.66 x 10 ³	0.219	NEG	NR
LVB/11 - 34790	POS	POS	31.15	4.41 x 10 ³	0.117	NEG	NR
LVB/12 - 1726	POS	POS	27.60	3.99 x 10 ⁴	0.064	NEG	NR
LVB/12 - 2883	POS	POS	29.17	1.49 x 10 ⁴	0.074	NEG	NR
LVB/12 - 7859	POS	POS	29.14	1.52 x 10 ⁴	0.058	NEG	NR
LVB/12 - 10288	NEG	NEG	-	-	0.074	NEG	NR
LVB/12 - 12261	POS	POS	27.91	3.30 x 10 ⁴	0.123	NEG	NR
LVB/12 - 12562	NEG	POS	30.84	5.28 x 10 ³	0.049	NEG	NR
LVB/12 - 12348	POS	POS	36.30	3.35 x 10 ²	0.128	NEG	NR
LVB/12 - 13795	POS	POS	32.63	1.92 x 10 ³	0.099	NEG	NR

AMOSTRA N°	RT-PCR	qRT-PCR			ELISA		VN
	Convencional	Resultado	Cp	Concentração	DO	Resultado	
LVB/12 – 13796	POS	POS	30.79	5.44 x 10 ³	0.095	NEG	NR
LVB/12 – 15591	POS	POS	29.18	1.47 x 10 ⁴	0.136	NEG	NR
LVB/12 – 15604	POS	POS	30.95	4.96 x 10 ³	0.115	NEG	NR
LVB/12 – 16425	POS	POS	28.02	2.70 x 10 ⁴	0.193	NEG	NR
LVB/12 - 18829	NEG	NEG	-	-	0.122	NEG	NR
LVB/12 - 19797	POS	POS	29.90	9.37 x 10 ³	0.130	NEG	NR
LVB/12 - 20767	POS	POS	32.04	2.64 x 10 ³	0.156	NEG	NR
LVB/12 - 20768	POS	POS	29.74	1.03 x 10 ⁴	0.148	NEG	NR
LVB/12 - 20769	POS	POS	29.27	1.34 x 10 ⁴	0.187	NEG	NR
LVB/12 - 22776	POS	POS	29.59	1.14 x 10 ⁴	0.163	NEG	NR
LVB/12 - 23020	POS	POS	31.11	4.51 x 10 ³	0.168	NEG	NR
LVB/12 - 23341	POS	POS	28.96	1.69 x 10 ⁴	0.161	NEG	NR
LVB/12 - 23347	POS	POS	29.26	1.40 x 10 ⁴	0.131	NEG	NR
LVB/12 - 25708	POS	POS	30.12	8.15 x 10 ³	0.151	NEG	NR
LVB/12 - 26850	NEG	POS	37.36	2.32 x 10 ²	0.120	NEG	NR
LVB/12 - 28157	POS	POS	27.66	5.20 x 10 ⁴	0.174	NEG	NR
LVB/12 - 28167	POS	POS	28.87	2.03 x 10 ⁴	0.215	NEG	NR
LVB/12 - 29449	POS	POS	27.98	3.13 x 10 ⁴	0.156	NEG	NR
LVB/12 - 30368	POS	POS	28.61	2.11 x 10 ⁴	0.195	NEG	NR
POSITIVOS	121		141			33	3
NEGATIVOS	51		31			139	169
TOTAL	172		172			172	172

ANEXO 4 - Sequência do BVDV-1, estirpe NADL, retirada do *GenBank*®, alinhada com o vírus padrão NADL do LVB

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
M31182.1|BVDV 1-NADL GAGGC TAGCC ATGCC CTTAG TAGG ACTAG CATAA TGAG GGGGG TAGC AACAG TGG TGAG TTCG TTGG ATGG CTTA AGCC CTTAG TAC AGGG TAGT CGT CA
LVB_BVD I -----TTAGCC ATGCC CTTAG TAGG ACTAG CATAA TGAG GGGGG TAGC AACAG TGG TGAG TTCG TTGG ATGG CTTA AGCC CTTAG TAC AGGG TAGT CGT CA

```

(continuação)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
M31182.1|BVDV 1-NADL GTGG TTCG ACG -- CCTT GGAATAAAG -GTC TCGAG ATGC -CACGT GGACG AGGG CATGCC CAAAGCAC ATCTT AACCTG AGCG GGGGGTCGC -CCAGGTAA
LVB_BVD I GTGG TTCG ACG -- CCTT GGAATAAAG -GTC TCGAG ATGC -CACGT GGACG AGGG CATGCC CAAAGCAC ATCTT AACCTG AGCG GGGGGTCGC -CCAGGTAA

```

(continuação)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
M31182.1|BVDV 1-NADL --AAGCAG TTTTAACCGACTGTTACGAA TACAG CCTGATAGGG TGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTAC -TAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGG
LVB_BVD I --AAGCAG TTTTAACCGACTGTTACGAA TACAG CCTGATAGGG TGCTGCAGAGGCCACTGTATTGCTAC -TAAAAATCTCTGCTGTACATGGCACATGG

```

(continuação)

```

.....|.
M31182.1|BVDV 1-NADL AGTTGA
LVB_BVD I AGTAAA

```

ANEXO 5 - Sequência de um isolado de BVDV-2 , do gene 5'UTR (KIM et al., 2009), retirada do *GenBank*®, alinhada com o vírus padrão VS-253 do LVB

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
FJ387322.1| BVDV2 12814306 (B) -----CATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATGGCCGAACCCCTGAGTACAGGGGAGTCGTCAATGG
LVB_BVD II --AGCCATGCCCTTAGTAGGACTAGCAAAGGAGGGGACTAGCGGTAGCAGTGAGTTCATTGGATGGCCGAACCCCTGAGTACAGAGGAGTCGTCAATGG

```

(continuação)

```

          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
FJ387322.1| BVDV2 12814306 (B) TTTCGACACTCCTTTCAGTTGAGGAGTCTCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGGCACATCTTAACCCATGCGGGGGCTGCATGGGTGAAAGCGC
LVB_BVD II TTTCGACACTCCTTTCAGTTGAGGAGTCTCGAGATGCCATGTGGACGAGGGCATGCCACGGGCACATCTTAACCTATGCGGGGGCTGCATGGGTGAAAGCGC

```

(continuação)

```

          210     220     230     240     250     260     270     280
FJ387322.1| BVDV2 12814306 (B) CATTCTGGCGTTATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACCTGCTATCCCGCTAGTAAAAAACTCTGCTGTACATGGCAC
LVB_BVD II CATTCTGGCGTTATGGACACAGCCTGATAGGGTGTAGCAGAGACCTGCTATCCCGCTAGTAAAAAACTCTGCTGTACATGCAACA

```

ANEXO 6 - Tabulação dos custos envolvidos na RT-PCR convencional e qRT-PCR para detecção do BVDV-1 e 2.

Método	Etapa	Tipo Material	Descrição Material	Embalagem	Medida	Tipo Custo	QTD por embalagem	Preço Unitário	QTD Uso	% Uso	Total
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Descarte do Fluxo	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 15,00	2	200,00%	R\$ 30,00
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Saco lixo fluxo	Pacote	Unidade	Variável	50	R\$ 5,55	2	4,00%	R\$ 0,22
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Estante microtubo	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 48,97	2	200,00%	R\$ 97,93
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Microtubo 1,5 mL	Pacote	Unidade	Variável	500	R\$ 33,39	2	0,40%	R\$ 0,13
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Ponteiras 1 mL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 186,03	11	1,10%	R\$ 2,05
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Ponteira 100 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 182,68	5	0,50%	R\$ 0,91
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Ponteiras 200 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 182,68	5	0,50%	R\$ 0,91
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Pipeta de 100 - 1000 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 444,49	1	100,00%	R\$ 444,49
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Pipeta de 20 - 200 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 411,18	1	100,00%	R\$ 411,18
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Pipeta de 10 - 100 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 411,18	1	100,00%	R\$ 411,18
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Suporte de pipetas	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 163,09	1	100,00%	R\$ 163,09
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Tubo Falcon 50 mL	Pacote	Unidade	Variável	20	R\$ 34,68	3	15,00%	R\$ 5,20
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Caneta para microtubo	Caixa	Unidade	Fixo	12	R\$ 22,30	1	8,33%	R\$ 1,86
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Lixeira com pedal 15 L	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 41,70	1	100,00%	R\$ 41,70
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Saco autoclave	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 12,90	1	10,00%	R\$ 1,29
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Descarte de Líquido	Unitário	Unidade	Variável	1	R\$ 0,35	1	100,00%	R\$ 0,35
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Termômetro Refrigerador	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 50,00	1	100,00%	R\$ 50,00
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais	Gaze	Rolo	Metros	Variável	90	R\$ 69,00	0,8	0,89%	R\$ 0,61
PCR e qPCR	1_Extração	Equipamentos	Cabine de Segurança Biológica	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 24.000,00	1	100,00%	R\$ 24.000,00
PCR e qPCR	1_Extração	Equipamentos	Centrífuga refrigerada	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 27.831,00	1	100,00%	R\$ 27.831,00
PCR e qPCR	1_Extração	Equipamentos	Vórtex	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 668,00	1	100,00%	R\$ 668,00
PCR e qPCR	1_Extração	Equipamentos	Espectrofotômetro	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 7.273,24	1	100,00%	R\$ 7.273,24
PCR e qPCR	1_Extração	Equipamentos	Refrigerador	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.539,00	1	100,00%	R\$ 1.539,00
PCR e qPCR	1_Extração	Reagentes	Álcool	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 24,93	0,25	0,03%	R\$ 0,01

Método	Etapa	Tipo Material	Descrição Material	Embalagem	Medida	Tipo Custo	QTD por embalagem	Preço Unitário	QTD Uso	% Uso	Total
PCR e qPCR	1_Extração	Reagentes	Isopropanol	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 14,98	0,8	0,08%	R\$ 0,01
PCR e qPCR	1_Extração	Reagentes	Clorofórmio	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 21,78	0,2	0,02%	R\$ 0,0044
PCR e qPCR	1_Extração	Reagentes	Trizol LS	Frasco	mL	Variável	200	R\$ 765,92	0,75	0,38%	R\$ 2,87
PCR e qPCR	1_Extração	Reagentes	RNAzap	Frasco	mL	Variável	250	R\$ 187,38	0,083	0,03%	R\$ 0,06
PCR e qPCR	1_Extração	Reagentes	Nuclease Free Water	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 182,00	0,05	0,01%	R\$ 0,01
PCR e qPCR	1_Extração	EPIs	Luvras	Caixa	Unidade	Variável	1000	R\$ 19,85	6	0,60%	R\$ 0,12
PCR e qPCR	1_Extração	EPIs	Avental	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 21,24	1	10,00%	R\$ 2,12
PCR e qPCR	1_Extração	EPIs	Máscara	Caixa	Unidade	Variável	50	R\$ 4,90	2	4,00%	R\$ 0,20
PCR e qPCR	1_Extração	EPIs	Touca	Pacote	Unidade	Variável	100	R\$ 5,00	1	1,00%	R\$ 0,05
PCR e qPCR	1_Extração	EPIs	Pro-pé	Caixa	Unidade	Variável	100	R\$ 7,99	2	2,00%	R\$ 0,16
PCR e qPCR	1_Extração	Materiais fixos	Borrifador Plástico	Unitário	mL	Fixo	1	R\$ 13,50	1	100,00%	R\$ 13,50
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Descarte do Fluxo	Pacote	Unidade	Variável	100	R\$ 216,32	0,033	0,03%	R\$ 0,07
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Estante microtubo	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 48,97	2	200,00%	R\$ 97,93
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Cooler	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 356,50	2	200,00%	R\$ 713,00
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Microtubo 1,5 mL	Pacote	Unidade	Variável	500	R\$ 33,06	1	0,20%	R\$ 0,07
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Microtubo 0,2 mL	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 248,97	2	0,20%	R\$ 0,50
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Ponteiras 1 mL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 186,03	2	0,20%	R\$ 0,37
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Ponteiras 200 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 182,68	2	0,20%	R\$ 0,37
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Ponteira 100 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 182,62	2	0,20%	R\$ 0,37
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Ponteira 10 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 168,91	4	0,40%	R\$ 0,68
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Pipeta 0,1 - 2,5 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 643,41	1	100,00%	R\$ 643,41
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Pipeta de 0,5 - 10 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 477,82	1	100,00%	R\$ 477,82
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Pipeta de 2 - 20 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 411,20	1	100,00%	R\$ 411,20
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Pipeta de 20 - 200 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 411,18	1	100,00%	R\$ 411,18
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Pipeta de 100 - 1000 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 444,49	1	100,00%	R\$ 444,49
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Suporte de pipetas	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 163,09	1	100,00%	R\$ 163,09
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Caneta para microtubo	Caixa	Unidade	Fixo	12	R\$ 22,30	1	8,33%	R\$ 1,86
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Lixeira com pedal 15 L	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 41,70	1	100,00%	R\$ 41,70

Método	Etapa	Tipo Material	Descrição Material	Embalagem	Medida	Tipo Custo	QTD por embalagem	Preço Unitário	QTD Uso	% Uso	Total
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Termômetro Freezer	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 50,00	1	100,00%	R\$ 50,00
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Saco autoclave	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 12,90	1	10,00%	R\$ 1,29
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Gaze	Rolo	Metros	Variável	90	R\$ 69,00	0,8	0,89%	R\$ 0,61
qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais	Placa de corrida Real Time	Pacote	Unidade	Variável	50	R\$ 1.673,00	0,01	0,02%	R\$ 0,33
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Equipamentos	Fluxo laminar	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 9.132,94	1	100,00%	R\$ 9.132,94
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Equipamentos	Centrífuga microtubos	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.175,61	1	100,00%	R\$ 1.175,61
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Equipamentos	Vórtex	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 668,00	1	100,00%	R\$ 668,00
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Equipamentos	Freezer	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.579,00	1	100,00%	R\$ 1.579,00
PCR	2_Mistura reagentes	Reagentes	Access Quick + AMV	Unitário	Unidade	Variável	100	R\$ 1.709,00	1	1,00%	R\$ 17,09
PCR	2_Mistura reagentes	Reagentes	Primers Convencional (2)	Frasco	mL	Variável	2	R\$ 140,00	0,0025	0,13%	R\$ 0,18
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Reagentes	Isopropanol	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 14,98	0,3	0,03%	R\$ 0,0045
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Reagentes	RNAzap	Frasco	mL	Variável	250	R\$ 187,38	0,083	0,03%	R\$ 0,06
qPCR	2_Mistura reagentes	Reagentes	Kit VetMAX™	Unitário	Unidade	Variável	100	R\$ 1.712,92	1	1,00%	R\$ 17,13
qPCR	2_Mistura reagentes	Reagentes	Riboprobe® Systems SP6/T7	Unitário	Unidade	Variável		R\$ 935,00			
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	EPIs	Luvas	Caixa	Unidade	Variável	1000	R\$ 19,85	4	0,40%	R\$ 0,08
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	EPIs	Avental	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 21,24	1	10,00%	R\$ 2,12
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	EPIs	Máscara	Caixa	Unidade	Variável	50	R\$ 4,90	1	2,00%	R\$ 0,10
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	EPIs	Touca	Pacote	Unidade	Variável	100	R\$ 5,00	1	1,00%	R\$ 0,05
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	EPIs	Pro-pé	Caixa	Unidade	Variável	100	R\$ 7,99	2	2,00%	R\$ 0,16
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Materiais fixos	Borrifador Plástico	Unitário	mL	Fixo	1	R\$ 13,50	1	100,00%	R\$ 13,50
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais	Descarte do Fluxo	Unitário	Unidade	Variável	100	R\$ 216,32	0,033	0,03%	R\$ 0,07
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Estante microtubo	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 48,97	2	200,00%	R\$ 97,93
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Cooler	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 356,50	1	100,00%	R\$ 356,50
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais	Ponteira 10 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 164,38	1	0,10%	R\$ 0,16
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Pipeta de 0,5 - 10 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 477,82	1	100,00%	R\$ 477,82
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Suporte de pipetas	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 163,09	1	100,00%	R\$ 163,09
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Caneta para microtubo	Caixa	Unidade	Fixo	12	R\$ 22,30	1	8,33%	R\$ 1,86
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Lixeira com pedal 15 L	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 41,70	1	100,00%	R\$ 41,70

Método	Etapa	Tipo Material	Descrição Material	Embalagem	Medida	Tipo Custo	QTD por embalagem	Preço Unitário	QTD Uso	% Uso	Total
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Termômetro Freezer	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 50,00	1	100,00%	R\$ 50,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais	Saco autoclave	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 12,90	1	10,00%	R\$ 1,29
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais	Gaze	Rolo	Metros	Variável	90	R\$ 69,00	0,8	0,89%	R\$ 0,61
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Equipamentos	Fluxo laminar	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 9.132,94	1	100,00%	R\$ 9.132,94
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Equipamentos	Centrífuga microtubos	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.175,61	1	100,00%	R\$ 1.175,61
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Equipamentos	Vórtex	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 668,00	1	100,00%	R\$ 668,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Equipamentos	Freezer	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.579,00	1	100,00%	R\$ 1.579,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Reagentes	Isopropanol	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 14,98	0,3	0,03%	R\$ 0,0045
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Reagentes	RNAzap	Frasco	mL	Variável	250	R\$ 187,38	0,083	0,03%	R\$ 0,06
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	EPIs	Luvas	Caixa	Unidade	Variável	1000	R\$ 19,85	2	0,20%	R\$ 0,04
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	EPIs	Avental	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 21,24	1	10,00%	R\$ 2,12
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	EPIs	Máscara	Caixa	Unidade	Variável	50	R\$ 4,90	1	2,00%	R\$ 0,10
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	EPIs	Touca	Pacote	Unidade	Variável	100	R\$ 5,00	1	1,00%	R\$ 0,05
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	EPIs	Pro-pé	Caixa	Unidade	Variável	100	R\$ 7,99	2	2,00%	R\$ 0,16
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Materiais fixos	Borrifador Plástico	Unitário	mL	Fixo	1	R\$ 13,50	1	100,00%	R\$ 13,50
PCR	4_Sala Amplificação	Equipamentos	Termociclador (PCR conv.)	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 34.240,90	1	100,00%	R\$ 34.240,90
qPCR	4_Sala Amplificação	Equipamentos	Real Time + computador	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 200.000,00	1	100,00%	R\$ 200.000,00
PCR	4_Sala Amplificação	Equipamentos	Freezer	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.579,00	1	100,00%	R\$ 1.579,00
PCR e qPCR	4_Sala Amplificação	Materiais fixos	Termômetro Freezer	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 50,00	1	100,00%	R\$ 50,00
PCR e qPCR	4_Sala Amplificação	Materiais fixos	Termômetro Refrigerador	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 50,00	1	100,00%	R\$ 50,00
qPCR	4_Sala Amplificação	Equipamentos	Centrífuga de Placa	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 99.000,00	1	100,00%	R\$ 99.000,00
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Descarte do Fluxo	Unitário	Unidade	Variável	100	R\$ 216,32	0,033	0,03%	R\$ 0,07
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Microtubo 1,5 mL	Pacote	Unidade	Variável	500	R\$ 33,06	1	0,20%	R\$ 0,07
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Ponteira 100 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 182,62	2	0,20%	R\$ 0,37
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Ponteira 10 µL com filtro	Pacote	Unidade	Variável	1000	R\$ 168,91	5	0,50%	R\$ 0,84
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Pipeta de 10 - 100 µL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 411,18	1	100,00%	R\$ 411,18
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Suporte de pipetas	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 163,09	1	100,00%	R\$ 163,09
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Caneta para microtubo	Caixa	Unidade	Fixo	12	R\$ 22,30	1	8,33%	R\$ 1,86

Método	Etapa	Tipo Material	Descrição Material	Embalagem	Medida	Tipo Custo	QTD por embalagem	Preço Unitário	QTD Uso	% Uso	Total
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Lixeira com pedal 15 L	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 41,70	1	100,00%	R\$ 41,70
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Saco autoclave	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 12,90	1	10,00%	R\$ 1,29
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Gaze	Rolo	Metros	Variável	90	R\$ 69,00	0,8	0,89%	R\$ 0,61
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Proveta 50 mL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 7,39	1	100,00%	R\$ 7,39
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Proveta 1 Litro	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 34,16	1	100,00%	R\$ 34,16
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Proveta 500 mL	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 23,45	1	100,00%	R\$ 23,45
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Schott	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 39,74	1	100,00%	R\$ 39,74
PCR	5_Eletroforese	Materiais	Parafilm	Rolo	Metros	Variável	38	R\$ 90,93	0,005	0,01%	R\$ 0,01
PCR	5_Eletroforese	Equipamentos	Balança semi-analítica	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 1.622,34	1	100,00%	R\$ 1.622,34
PCR	5_Eletroforese	Equipamentos	Cuba eletroforese	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 2.035,50	1	100,00%	R\$ 2.035,50
PCR	5_Eletroforese	Equipamentos	Fonte da cuba	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 2.124,38	1	100,00%	R\$ 2.124,38
PCR	5_Eletroforese	Equipamentos	Transiluminador + computador	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 10.447,80	1	100,00%	R\$ 10.447,80
PCR	5_Eletroforese	Equipamentos	Microondas	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 319,00	1	100,00%	R\$ 319,00
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	Agarose	Frasco	Gramas	Variável	500	R\$ 1.883,00	0,21	0,04%	R\$ 0,79
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	TBE 10x	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 125,00	14	1,40%	R\$ 1,75
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	Gel Red (Uniscience)	Frasco	mL	Variável	0,5	R\$ 661,44	0,001	0,20%	R\$ 1,32
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	Loading Buffer	Frasco	mL	Variável	8	R\$ 145,24	0,002	0,03%	R\$ 0,04
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	Par de base	Frasco	mL	Variável	1	R\$ 317,50	0,001	0,10%	R\$ 0,32
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	Isopropanol	Frasco	mL	Variável	1000	R\$ 14,98	0,3	0,03%	R\$ 0,0045
PCR	5_Eletroforese	Equipamentos	Aparelho de osmose reversa 10L/H	Unitário	Unidade	Fixo	1	R\$ 2.766,00	1	100,00%	R\$ 2.766,00
PCR	5_Eletroforese	Reagentes	RNAzap	Frasco	mL	Variável	250	R\$ 187,38	0,083	0,03%	R\$ 0,06
PCR	5_Eletroforese	EPIs	Luvas	Caixa	Unidade	Variável	1000	R\$ 19,85	6	0,60%	R\$ 0,12
PCR	5_Eletroforese	EPIs	Avental	Pacote	Unidade	Variável	10	R\$ 21,24	1	10,00%	R\$ 2,12
PCR	5_Eletroforese	EPIs	Máscara	Caixa	Unidade	Variável	50	R\$ 4,90	2	4,00%	R\$ 0,20
PCR	5_Eletroforese	EPIs	Touca	Pacote	Unidade	Variável	100	R\$ 5,00	1	1,00%	R\$ 0,05
PCR	5_Eletroforese	EPIs	Pro-pé	Caixa	Unidade	Variável	100	R\$ 7,99	2	2,00%	R\$ 0,16
PCR	5_Eletroforese	Materiais fixos	Borrifador Plástico	Unitário	mL	Fixo	1	R\$ 13,50	1	100,00%	R\$ 13,50

Método	Etapa	Descrição Material	Tipo Custo	Preço Unitário	Vida útil (mês)	Valor Residual	Depreciação (mês)	Valor Certificação	Duração (mês)	Certificação (mês)
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Fluxo laminar	Fixo	R\$ 9.132,94	120	R\$ 0,00	R\$ 76,11	R\$ 750,00	12	R\$ 62,50
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Centrífuga microtubos	Fixo	R\$ 1.175,61	120	R\$ 0,00	R\$ 9,80	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Vórtex	Fixo	R\$ 668,00	120	R\$ 0,00	R\$ 5,57	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Freezer	Fixo	R\$ 1.579,00	120	R\$ 0,00	R\$ 13,16	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	2_Mistura reagentes	Access Quick + AMV	Variável	R\$ 1.709,00	----	----	----	----	----	----
PCR	2_Mistura reagentes	Primers Convencional (2)	Variável	R\$ 140,00	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Isopropanol	Variável	R\$ 14,98	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	RNAzap	Variável	R\$ 187,38	----	----	----	----	----	----
qPCR	2_Mistura reagentes	Kit VetMAX™	Variável	R\$ 1.712,92	----	----	----	----	----	----
qPCR	2_Mistura reagentes	Riboprobe® Systems SP6/T7	Variável	R\$ 935,00	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Luvas	Variável	R\$ 19,85	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Avental	Variável	R\$ 21,24	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Máscara	Variável	R\$ 4,90	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Touca	Variável	R\$ 5,00	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Pro-pé	Variável	R\$ 7,99	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	2_Mistura reagentes	Borrifador Plástico	Fixo	R\$ 13,50	60	R\$ 0,00	R\$ 0,23	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Descarte do Fluxo	Variável	R\$ 216,32	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Estante microtubo	Fixo	R\$ 48,97	60	R\$ 0,00	R\$ 0,82	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Cooler	Fixo	R\$ 356,50	60	R\$ 0,00	R\$ 5,94	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Ponteira 10 µL com filtro	Variável	R\$ 164,38	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Pipeta de 0,5 - 10 µL	Fixo	R\$ 477,82	60	R\$ 0,00	R\$ 7,96	R\$ 65,00	12	R\$ 5,42
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Suporte de pipetas	Fixo	R\$ 163,09	60	R\$ 0,00	R\$ 2,72	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Caneta para microtubo	Fixo	R\$ 22,30	60	R\$ 0,00	R\$ 0,37	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Lixeira com pedal 15 L	Fixo	R\$ 41,70	60	R\$ 0,00	R\$ 0,70	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Termômetro Freezer	Fixo	R\$ 50,00	60	R\$ 0,00	R\$ 0,83	R\$ 72,50	12	R\$ 6,04
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Saco autoclave	Variável	R\$ 12,90	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Gaze	Variável	R\$ 69,00	----	----	----	----	----	----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Fluxo laminar	Fixo	R\$ 9.132,94	120	R\$ 0,00	R\$ 76,11	R\$ 750,00	12	R\$ 62,50
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Centrífuga microtubos	Fixo	R\$ 1.175,61	120	R\$ 0,00	R\$ 9,80	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00

Método	Etapa	Descrição Material	Tipo Custo	Preço Unitário	Vida útil (mês)	Valor Residual	Depreciação (mês)	Valor Certificação	Duração (mês)	Certificação (mês)
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Vórtex	Fixo	R\$ 668,00	120	R\$ 0,00	R\$ 5,57	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Freezer	Fixo	R\$ 1.579,00	120	R\$ 0,00	R\$ 13,16	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Isopropanol	Variável	R\$ 14,98	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	RNAzap	Variável	R\$ 187,38	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Luvas	Variável	R\$ 19,85	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Avental	Variável	R\$ 21,24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Máscara	Variável	R\$ 4,90	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Touca	Variável	R\$ 5,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Pro-pé	Variável	R\$ 7,99	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR e qPCR	3_Aplicação Amostra	Borrifador Plástico	Fixo	R\$ 13,50	60	R\$ 0,00	R\$ 0,23	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	4_Sala Amplificação	Termociclador (PCR conv.)	Fixo	R\$ 34.240,90	120	R\$ 0,00	R\$ 285,34	R\$ 852,15	12	R\$ 71,01
qPCR	4_Sala Amplificação	Real Time + computador	Fixo	R\$ 200.000,00	120	R\$ 0,00	R\$ 1.666,67	R\$ 10.000,00	12	R\$ 833,33
PCR	4_Sala Amplificação	Freezer	Fixo	R\$ 1.579,00	120	R\$ 0,00	R\$ 13,16	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR e qPCR	4_Sala Amplificação	Termômetro Freezer	Fixo	R\$ 50,00	60	R\$ 0,00	R\$ 0,83	R\$ 72,50	12	R\$ 6,04
PCR e qPCR	4_Sala Amplificação	Termômetro Refrigerador	Fixo	R\$ 50,00	60	R\$ 0,00	R\$ 0,83	R\$ 72,50	12	R\$ 6,04
qPCR	4_Sala Amplificação	Centrífuga de Placa	Fixo	R\$ 99.000,00	120	R\$ 0,00	R\$ 825,00	R\$ 300,00	12	R\$ 25,00
PCR	5_Eletoforese	Descarte do Fluxo	Variável	R\$ 216,32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletoforese	Microtubo 1,5 mL	Variável	R\$ 33,06	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletoforese	Ponteira 100 µL com filtro	Variável	R\$ 182,62	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletoforese	Ponteira 10 µL com filtro	Variável	R\$ 168,91	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletoforese	Pipeta de 10 - 100 µL	Fixo	R\$ 411,18	60	R\$ 0,00	R\$ 6,85	R\$ 65,00	12	R\$ 5,42
PCR	5_Eletoforese	Suporte de pipetas	Fixo	R\$ 163,09	60	R\$ 0,00	R\$ 2,72	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletoforese	Caneta para microtubo	Fixo	R\$ 22,30	60	R\$ 0,00	R\$ 0,37	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletoforese	Lixeira com pedal 15 L	Fixo	R\$ 41,70	60	R\$ 0,00	R\$ 0,70	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletoforese	Saco autoclave	Variável	R\$ 12,90	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletoforese	Gaze	Variável	R\$ 69,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletoforese	Proveta 50 mL	Fixo	R\$ 7,39	60	R\$ 0,00	R\$ 0,12	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletoforese	Proveta 1 Litro	Fixo	R\$ 34,16	60	R\$ 0,00	R\$ 0,57	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletoforese	Proveta 500 mL	Fixo	R\$ 23,45	60	R\$ 0,00	R\$ 0,39	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletoforese	Schott	Fixo	R\$ 39,74	60	R\$ 0,00	R\$ 0,66	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00

Método	Etapa	Descrição Material	Tipo Custo	Preço Unitário	Vida útil (mês)	Valor Residual	Depreciação (mês)	Valor Certificação	Duração (mês)	Certificação (mês)
PCR	5_Eletroforese	Parafilm	Variável	R\$ 90,93	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Balança semi-analítica	Fixo	R\$ 1.622,34	120	R\$ 0,00	R\$ 13,52	R\$ 80,00	12	R\$ 6,67
PCR	5_Eletroforese	Cuba eletroforese	Fixo	R\$ 2.035,50	120	R\$ 0,00	R\$ 16,96	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletroforese	Fonte da cuba	Fixo	R\$ 2.124,38	120	R\$ 0,00	R\$ 17,70	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletroforese	Transiluminador + computador	Fixo	R\$ 10.447,80	120	R\$ 0,00	R\$ 87,07		12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletroforese	Microondas	Fixo	R\$ 319,00	120	R\$ 0,00	R\$ 2,66	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletroforese	Agarose	Variável	R\$ 1.883,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	TBE 10x	Variável	R\$ 125,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Gel Red (Uniscience)	Variável	R\$ 661,44	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Loading Buffer	Variável	R\$ 145,24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Par de base	Variável	R\$ 317,50	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Isopropanol	Variável	R\$ 14,98	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Aparelho de osmose reversa 10L/H	Fixo	R\$ 2.766,00	120	R\$ 0,00	R\$ 23,05	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00
PCR	5_Eletroforese	RNAzap	Variável	R\$ 187,38	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Luvas	Variável	R\$ 19,85	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Avental	Variável	R\$ 21,24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Máscara	Variável	R\$ 4,90	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Touca	Variável	R\$ 5,00	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Pro-pé	Variável	R\$ 7,99	-----	-----	-----	-----	-----	-----
PCR	5_Eletroforese	Borrifador Plástico	Fixo	R\$ 13,50	60	R\$ 0,00	R\$ 0,23	R\$ 0,00	12	R\$ 0,00



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO

