

DANIELA DA SILVA PEREIRA CAMPINHO

**ESTUDO MOLECULAR DE *PESTIVIRUS* EM AMOSTRAS DE CULTURA  
CELULAR E SORO DE PEQUENOS RUMINANTES**

Recife

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

DANIELA DA SILVA PEREIRA CAMPINHO

**ESTUDO MOLECULAR DE *PESTIVIRUS* EM AMOSTRAS DE CULTURA  
CELULAR E SORO DE PEQUENOS RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Roberto Soares Castro

RECIFE

-2012-

### Ficha Catalográfica

C196e      Campinho, Daniela da Silva Pereira  
cultura      Estudo molecular de pestivirus em amostras de  
celular e soro de pequenos ruminantes / Daniela da Silva  
Pereira Campinho. -- Recife, 2012.  
40 f. : il.

Orientador (a): Roberto Soares de Castro.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Departamento  
de Medicina Veterinária, Recife, 2012.  
Referências.

1. Pestiviroses 2. Caprino 3. Ovino 4. Biologia  
molecular  
I. Castro, Roberto Soares, orientador II. Título

CDD 636

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ESTUDO MOLECULAR DE *PESTIVIRUS* EM AMOSTRAS DE  
CULTURA CELULAR E SORO DE PEQUENOS RUMINATES**

Dissertação elaborada por

DANIELA DA SILVA PEREIRA CAMPINHO

Aprovada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Roberto Soares Castro

Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Profa. Dra. Rita de C. C. Maia

Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

PhD. Ana Lisa Gomes

Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Dra. Adriana Soares Leite

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho com muita honra e amor, Ao meu esposo, Adalberto, amor da minha vida, parceiro de todos os momentos, paciente e perseverante com meus momentos de ausência, incansável na força que sempre me deu na minha vida pessoal e profissional. E ao meu filho João Pedro, que desde a vida intra-uterina me dividiu com a vida acadêmica, que mesmo tão pequeno me fez aprender o que é amor incondicional, imensurável, infinito, ensinou-me o que é a razão de viver.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo seu infinito amor, graça e misericórdia, pois apesar dos momentos de angústia colocou os meus pés sobre a rocha e me firmou os passos.

Minha eterna gratidão aos meus amados pais por tudo de bom que me ensinaram, por cada momento de dedicação na educação e principalmente por reafirmarem em meu ser que caráter e educação são os maiores legados que se pode deixar para um filho. Por vocês o mais sublime e indescritível amor!

Ao Meu Grande Amor Adalberto Campinho, pelo apoio incondicional, pela paciência e amor dedicados a mim, por entender minha ausência, por me fazer acreditar que sou capaz, por me “suportar” por esses anos e por outros que virão.

Ao meu filho amado João Pedro por fazer minha vida mais alegre com gestos tão simples como acordar sorrindo e até por não me deixar sentar para escrever este trabalho, pois isso mostra que minha atenção é importante para você e me faz sentir muito amada! TE AMO FILHO!

Às minhas irmãs: Amanda e Viviane pelo companheirismo, amor, pelos sobrinhos lindos e pelas vivências compartilhadas.

Aos que dedicaram amor, carinho e atenção ao meu pequeno na minha ausência, em especial, Tia Sula, Tio Etenir, Lívia, Amanda, Mainha e Painho sem o apoio de vocês esse trabalho não seria possível, essa conquista divido com vocês.

À todos meus familiares, tios, tias, primos, primas, avós, cunhadas e cunhados pelo apoio em toda minha vida

Às minhas comadres e grandes amigas Vanessa Anny e Priscilla Araújo, amigas fiéis e companheiras de todas as horas, dividindo os bons e maus momentos dessa caminhada. A vocês, queridas amigas, o meu muito obrigada pelo apoio, incentivo e pela amizade verdadeira.

Ao Professor Roberto Soares, que assumiu a responsabilidade dessa orientação, que com simplicidade e competência proporcionou-me ensinamentos.

À Professora Rita Maia, pelo apoio e ensinamentos dedicados de forma delicada.

À Ana Lisa pela contribuição, pelas longas conversas, discussões e sugestões e, especialmente pelo convívio e amizade.

Aos amigos companheiros trabalho Rosana, Camila, Cosme, Cecília, Inês, Sérgio, Karin e Luciana pela grande ajuda por estarem sempre dispostos ao trabalho diário e também pelo apoio e simpatia.

A Diogo Manoel, todos do Laboratório de Bacterioses do DMV/UFRPE e Sandra Arenhart pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

À Professora Silvia Sardi e ao LANAGRO, representado por Marta Nery pela concessão das amostras.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo financiamento (Processo 578341/2008-5, Edital MCT/CNPq/MAPA/SDA nº64/2008).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária pelo conhecimento transmitido.

A todos os Professores e Funcionários da UFRPE que contribuíram de forma direta e indireta para construção do meu conhecimento, pelo carinho e amizade.

## RESUMO

Em ruminantes as pestiviroses são frequentemente associadas a infecções subclínicas ou com sinais clínicos leves e passageiros, sendo as maiores perdas relacionadas com a infecção de fêmeas prenhes que podem causar perdas fetais e nascimento de animais persistentemente infectados (PI). Os *Pestivirus* estão distribuídos em muitos países, inclusive no Brasil, onde estudos em caprinos e ovinos são escassos. Vários estudos têm relatado a utilização de técnicas moleculares para a detecção de *Pestivirus*, dentre elas a RT-PCR e a RT-qPCR que são capazes de detectar animais PI, principal fonte de manutenção do vírus no rebanho. Objetivou-se com este estudo determinar o limite mínimo de detecção para *Pestivirus* a partir de sobrenadante de cultura celular e soro de pequenos ruminantes utilizando a RT-PCR e qRT-PCR. A extração dos ácidos nucléicos foi realizada com kit comercial QIAamp® MinElute® Virus Spin, a reação de transcriptase reversa seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante da enzima transcriptase reversa M-MLV. A avaliação do limite de detecção da RT-qPCR e RT-PCR para *Pestivirus* foi realizada utilizando uma curva de calibração (fator de diluição 10) com TCID<sub>50</sub>/mL conhecidas e decrescentes utilizando *primers* denominados panpestivírus. O limite de detecção da RT-qPCR em sobrenadante de cultura celular foi de 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL e da RT-PCR foi de 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, já o limite mínimo de detecção utilizando os soros caprino, ovino e Gibco® Lamb como diluentes foram de 1 TCID<sub>50</sub>/mL. Os ensaios realizados nas condições descritas nesse estudo demonstraram ser sensíveis, podendo ser utilizados como uma estratégia de diagnóstico etiológico do *Pestivirus*, sobretudo para a identificação molecular de animais PI, o que é essencial para o controle das pestiviroses.

**Palavras-chave:** Pestiviroses, caprinos, ovino, biologia molecular



## **ABSTRACT**

The Ruminants Pestiviruses are often associated with temporary and subclinical or mild clinical signs, with the largest losses related to the infection of pregnant females that can cause fetal loss and birth of persistently infected (PI) animals. The *Pestivirus* are distributed in many countries, including Brazil, where studies in goats and sheep are scarce. Several studies have reported the use of molecular techniques for detection of Pestivirus, among them, the RT-PCR and the RT-qPCR. They are able to detect PI animals, which are the main source of the virus-Care in the herd. The objective of this study was to determine the lower limit of detection for *Pestivirus* from supernatant cell culture and serum samples from small ruminants using RT-PCR and qRT-PCR. The extraction of nucleic acids was performed with a commercial kit QIAamp® MinElute® Virus Spin, the reverse transcriptase reaction followed the protocol recommended by the manufacturer of the enzyme reverse transcriptase M-MLV. The evaluation of the detection limit of RT-qPCR and RT-PCR was performed using a *Pestivirus* calibration curve (dilution factor 10) with known and decreasing TCID<sub>50</sub>/mL called panpestivirus using primers (Vilcek et al., 1994). The detection limit of RT-qPCR in cell culture supernatant was 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL and of RT-PCR was 10.2 TCID<sub>50</sub>/mL, since the lower limit of detection using sera weeding, sheep and Gibco® Lamb as a diluent were TCID<sub>50</sub>/mL. The tests conducted under the conditions described in this study proved to be sensitive and can be used as a strategy for etiologic diagnosis of *Pestivirus*, especially for the molecular identification of IP animals, which is essential for the control of Pestiviroses.

**Key-words:** Pestiviruses, goats, sheep, molecular biology

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	11
<b>2.1 Doença das Fronteiras</b>	11
<b>2.2 Classificação e Estrutura dos <i>Pestivirus</i></b>	11
<b>2.3 Distribuição</b>	14
<b>2.4 Transmissão</b>	14
<b>2.5 Patogenia e Manifestações Clínicas</b>	15
2.5.1 Infecção Aguda	15
2.5.2 Infecção Fetal	15
2.5.3 Infecção Persistente	16
<b>2.6 Diagnóstico</b>	17
2.6.1 Isolamento Viral	17
2.6.2 Detecção de Antígenos Virais	18
2.6.3 Testes Sorológicos	18
2.6.4 Detecção de ácidos Nucléicos	19
<b>2.7 Controle e Profilaxia</b>	21
<b>3 REFERÊNCIAS</b>	22
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b>	27
<b>4.1 Determinação do Limite Mínimo de Detecção da Técnica de RT-qPCR para <i>Pestivirus</i></b>	28

## 1 INTRODUÇÃO

As pestiviroses são reconhecidas como enfermidades responsáveis por perdas econômicas significativas em todo o mundo nos rebanhos bovino, caprino e ovino (LINDBERG, 2003). Seus agentes etiológicos estão classificados na família *Flaviviridae* e são membros do gênero *Pestivirus*. Três espécies de *Pestivirus* são reconhecidas: Vírus da Doença das Fronteiras (Border Disease Virus - BDV), Vírus da Diarréia Viral Bovina (Bovine viral diarrhea virus - BVDV) e Vírus da Peste Suína Clássica (Classical Swine fever vírus - CSFV) (RADOSTITS et al., 2002; POTGIETER, 2004).

Embora originalmente identificado a partir de casos de doença gastroentérica grave, os *Pestivirus* têm sido mais frequentemente associados às infecções subclínicas ou com sinais clínicos leves e passageiros. As maiores perdas estão geralmente relacionadas com a infecção de fêmeas prenhes. Os pestivírus têm a capacidade de atravessar a placenta e infectar o conceito, podendo causar mortalidade embrionária ou fetal, abortos ou mumificação fetal, malformações e nascimento de animais fracos e inviáveis, além de animais persistentemente infectados (PI). Os animais PI eliminam o vírus continuamente em grandes quantidades e constituem-se na principal fonte de disseminação do agente no rebanho (BAKER, 1995).

Os *Pestivirus* acometem caprinos e ovinos em diversos países provocando importantes perdas econômicas (VALDAZO-GONZALEZ et al., 2006). As taxas de prevalência variam em ovinos de 5% a 50% entre os países e de região para região do mesmo país (NETTLETON, 1998). No Brasil estudos nos rebanhos caprinos e ovinos sobre a ocorrência de *Pestivirus* são escassos, tendo sido realizado apenas dois levantamentos em Pernambuco um datado de 1994, em caprinos, onde foi observada prevalência de 11,6% (CASTRO et al., 1994). Outro mais recente realizado em rebanho caprino e ovino das mesorregiões do Sertão Pernambucano revelou prevalência de soropositivos de 10,89% e 6,98%, respectivamente (SILVA, 2009).

A profilaxia e o controle da infecção consistem fundamentalmente na identificação e remoção de animais PI das propriedades. Vários são os exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico definitivo, como o isolamento ou detecção de antígenos virais e/ou a demonstração da resposta sorológica ao vírus no animal infectado (RADOSTITS et al., 2002; SALIKI & DUBOVI, 2004). Os métodos moleculares, particularmente a Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), estão sendo universalmente adotados para o diagnóstico

etiológico de diversas viroses animais, inclusive das Pestivirose. As principais vantagens da abordagem molecular incluem rapidez na obtenção dos resultados, capacidade de detecção da presença viral em quantidade muito pequena de partícula viral, não exigência da infecciosidade da partícula viral e, quando devidamente padronizada, altas taxas de sensibilidade e especificidade (VILCEK et al., 1994; TAKIUCHI et al., 2003).

Atualmente, os procedimentos sorológicos e isolamento do vírus são os métodos escolhidos para o diagnóstico de *Pestivirus*. No entanto, resultados sorológicos negativos devem ser interpretados com cautela, uma vez que animais PI são aparentemente saudáveis, soronegativos e com qualidade de sêmen aceitável. A detecção de *Pestivirus* pela amplificação RT-PCR torna-se assim uma boa alternativa aos testes convencionais.

Vários autores têm descrito sistemas de detecção de BVDV pela técnica de RT-PCR bastante sensíveis. A partir de amostras de sobrenadante de cultura celular, Hamel et al. (1995) detectaram até 0,1 TCID<sub>50</sub>/mL, enquanto que Urano et al. (1998) observaram um limiar de detecção 10<sup>1.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL a partir de sobrenadante de cultura celular, soro e órgãos.

Visto a importância das pestivirose entre caprinos e ovinos que podem causar distúrbios reprodutivos, abortamento e defeitos congênitos e principalmente a formação de animais PI gerando perdas econômicas deve-se atentar para a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico de *Pestivirus*. Dentre essas ferramentas o diagnóstico molecular apresenta-se como uma técnica bastante sensível e específica, com vantagens sobre os métodos sorológicos e o isolamento viral para a detecção do agente em questão. Idealizou-se determinar o limite mínimo de detecção da técnica de RT-qPCR para *Pestivirus* a partir de sobrenadante de cultura celular e soro de pequenos ruminantes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Classificação e Estrutura dos *Pestivirus*

O Vírus da Doença das Fronteiras (Border Disease Virus - BDV) pertence ao gênero *Pestivirus* família *Flaviviridae*, que também inclui o Vírus da Diarréia Viral Bovina (Bovine viral diarrhea virus - BVDV) e o Vírus da Peste Suína Clássica (Classical Swine fever vírus - CSFV) (BECHER et al., 1998). Os vírus pertencentes a esse gênero são responsáveis por infectar um grande número de espécies de ungulados, como suínos, bovinos, caprinos e ovinos.

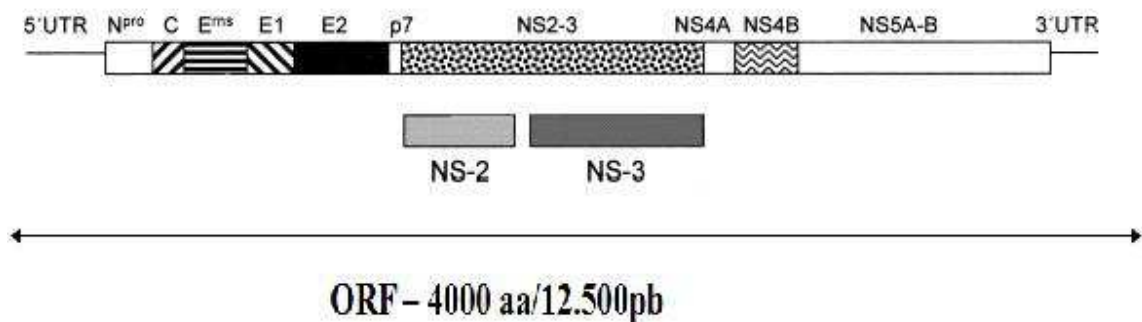
Inicialmente, a classificação dos *Pestivirus* era baseada no hospedeiro de origem, mas tornou-se inapropriada porque esses vírus não são espécie-específicos e podem infectar espécies que não sejam seus hospedeiros naturais. A caracterização antigênica por anticorpos monoclonais e a análise molecular do genoma permitiram a classificação dos *Pestivirus* em: CSFV, BVD tipos 1 e 2 e BDV nos ovinos, além de espécies em fase de reconhecimento, que incluem o Vírus Giraffe, correspondente a um isolado de uma girafa, Vírus HoBI isolado de antílope e Vírus Pronghorn, ramo composto por três vírus, sendo um isolado brasileiro de soro fetal bovino, um isolado contaminante de cultivo celular e outro isolado brasileiro de búfalo (FLORES, 2007; DUBOIS et al., 2008).

Estruturalmente os *Pestivirus* são uma partícula viral esférica, com cerca de 40 a 60nm de diâmetro, possuem um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por um envelope lipoprotéico, contendo três glicoproteínas virais: gp48/E0, gp25/E1 e gp53/E2 (DONIS, 1995). O material genético é uma molécula linear de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, com aproximadamente 12,3Kb, contendo uma única ORF (*open reading frame*), que é traduzida em uma poliproteína única com cerca de 4.000 aminoácidos (LINDENBACH & RICE, 2001). As extremidades do RNA viral são flanqueadas por duas regiões denominadas 5' (386 nucleotídeos) e 3' (226 nucleotídeos) não traduzidas (UTRs). Essas regiões são importantes para a replicação do genoma, estabilidade do RNA viral e expressão gênica (DONIS, 1995; LINDENBACH & RICE, 2001).

A clivagem da poliproteína por proteases celulares e virais dá origem entre 10 e 12 polipeptídeos estruturais e não estruturais (DONIS, 1995). A região 5'-UTR é a parte mais

estável do genoma dos pestivírus, por isto é o alvo favorito para diagnóstico pela PCR e análise filogenética. Embora o 3'-UTR do RNA seja funcionalmente importante para replicação viral, esta região tem recebido pouca atenção e sua variabilidade não está bem documentada (MEYERS & THIEL, 1996; VILCEK et al., 1999).

As proteínas estruturais são representadas pela proteína capsidial C e as três glicoproteínas denominadas E<sup>ms</sup>, E1 e E2. As demais são presumivelmente proteínas não-estruturais, NS, (N<sup>pro</sup>, P7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B). N<sup>pro</sup> remete a uma autoprotease da região N-terminal que não tem em outros *Flavivírus*, enquanto que a E2 desempenha um papel importante na adesão e entrada do vírus na célula. Além disso, E2 é também importante para a indução da produção de anticorpos neutralizantes (MEYERS & THIEL, 1996; DUBOIS et al., 2008) (Figura 1). Assim como a N<sup>PRO</sup>, a glicoproteína E<sup>RNS</sup> é exclusiva nos *Pestivírus* e não possui equivalente nos outros gêneros da família *Flaviviridae*, estando envolvida na resposta antiviral com a ativação na expressão de interferon. A N<sup>PRO</sup> apresenta antagonismo ao interferon, comprometendo a resposta imune adaptativa e também a resposta imune inata do hospedeiro (RUGGLI et al., 2005; MEYERS & THIEL et al., 1996).



**Figura 1** – Partícula viral de *Pestivirus*, mostrando proteínas estruturais representados pela proteína capsidial C e as três glicoproteínas E<sup>ms</sup>, E1 e E2 e proteínas não-estruturais N<sup>pro</sup>, P7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B (Adaptada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=pmd&part=A279>).

Variações de nucleotídeos em sequências conservadas situadas na região 5' UTR do genoma, permitiram a classificação do BDV em dois genótipos: BDV-A e BDV-B (VILCEK et al., 1997). Hurtado et al. (2003) propuseram um novo subtipo BDV-C isolado a partir de ovinos da Espanha.

Embora não sejam utilizados para diferenciar as espécies, dois biotipos existem entre os *Pestivirus*: citopático (cp) e os não-citopático (ncp). Os vírus ncp constituem-se na maioria dos isolados de campo e são capazes de produzir infecções persistentes em fetos, enquanto as amostras cp constituem uma minoria e são isoladas quase que exclusivamente de animais afetados pela Doença das Mucosas (DM). Os vírus cp se originam dos ncp por mutações e rearranjos genéticos, sendo a transformação de vírus ncp em cp reproduzida experimentalmente através de manipulações genéticas no RNA viral (BOLIN, 1995; MENDEZ et al., 1998).

Os biotipos ncp e cp podem ser diferenciados em nível molecular pela expressão e processamento distintos de dois polipeptídeos virais não-estruturais. Amostras ncp expressam apenas um polipeptídeo de aproximada 125 kDa, correspondente a NS2-3; em contraste, amostras cp expressam a NS2-3 e também um polipeptídeo de aproximadamente 80kDa (NS3), correspondente à porção 2/3 carboxi-terminal da NS2-3 (DONIS, 1995). A geração da NS3 nas amostras cp pode ocorrer pela clivagem da NS2-3 ou por duplicação do gene da NS3 (DONIS, 1995).

## **2.2 Doença das Fronteiras**

A Doença das Fronteiras (Border Disease - BD) foi descrita pela primeira vez em 1959 relatada como uma entidade clinicopatológica em ovinos na Grã-Bretanha (Hughes, 1959). A condição era endêmica na região fronteiriça entre Inglaterra e País de Gales, o que explica a origem do seu nome. A Doença das Fronteiras, também conhecida como doença de cordeiros peludos, tem sido relatada em diversos países (PRATELLI et al., 2001; THABTI et al., 2002; VILCEK & PANTON, 2000), é o resultado clínico da infecção por *Pestivirus* em ovinos e caprinos (VALDAZO-GONZALEZ et al., 2008).

A BD afeta cordeiros recém-nascidos que adquirem a infecção na vida intra-uterina a partir de mães PI com o vírus da BD ou que tenham sido infectadas com o vírus durante a gravidez. Dependendo da fase da gestação em exposição, os resultados possíveis de infecção viral incluem o aborto, o nascimento de animais PI com ou sem defeitos congênitos, ou o nascimento de cordeiros clinicamente normais com imunidade humoral à BDV (VALDAZO-GONZALEZ et al., 2006; HURTADO et al., 2009).

### 2.3 Distribuição

A BD é uma doença viral que acomete caprinos e ovinos em diversos países provocando importantes perdas econômicas (VALDAZO-GONZALEZ et al., 2006). As taxas de prevalência são bastante variáveis em ovinos, com prevalência de 5% a 50% entre os países e de região para região do mesmo país (NETTLETON, 1998).

Estudo realizado por Valdazo-Gonzalez et al. (2008) em soros caprino e ovino oriundos de matadouros de diferentes faixas etárias revelou uma baixa prevalência de 0,24% BDV na Espanha, já Berriatua et al. (2006) observaram uma soroprevalência de 68% em estudo em tanques de leite de rebanhos leiteiros do País Basco, também na Espanha. A soroprevalência de BDV é de 13,5% no Irã (KEYVANFAR et al., 1999) e de 20% no Canadá (HECKERT et al., 1994).

A infecção pelo BVDV tem sido descrita no Brasil desde o final dos anos 1960. Vários relatos clínico-patológicos, virológicos e sorológicos demonstram a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro (FLORES, 2007). Diversos estudos sorológicos têm sido realizados em várias regiões, demonstrando a ampla distribuição da infecção no rebanho bovino brasileiro com índices de soropositividade variando entre 18 e 84% (FLORES et al., 2005). Estudos nos rebanhos caprinos e ovinos sobre a ocorrência de *Pestivirus* são escassos, tendo sido realizado apenas dois levantamentos em Pernambuco: o primeiro, em caprinos, onde foi observada prevalência de 11,6% (CASTRO et al., 1994); o mais recente, um inquérito epidemiológico realizado em rebanho caprino e ovino da mesorregiões do Sertão Pernambucano, revelou prevalência de soropositivos para *Pestivirus* de 10,89% e 6,98%, respectivamente (SILVA, 2009). Estes resultados confirmam a circulação de *Pestivirus* no rebanho caprino e ovino no estado de Pernambuco, porém não há informações a cerca da espécie viral em questão. Devido ao histórico de abortos e nascimento de animais com defeitos congênitos no rebanho caprino e ovino e ocorrência de *Pestivirus* nesses animais se faz necessário mais estudos com este agente nesta população.

### 2.4 Transmissão



O BDV propaga-se naturalmente entre os ovinos, por via oro-nasal e por transmissão vertical, onde esta última tem um papel importante na epidemiologia da doença. A infecção de fetos pode resultar no nascimento de animais PI. Esses cordeiros PI são sorologicamente negativos, porém excretam constantemente o vírus, sendo os animais PI a fonte mais importante de infecção. Em muitas regiões, a causa mais comum da Doença das Fronteiras é o BDV, mas em algumas partes do mundo o BVDV pode ser uma das causas mais comuns de BD. A fonte de BVDV para os ovinos, com frequência, é o contato próximo com o bovino infectado (OIE, 2012). A transmissão parenteral de *Pestivirus* apresenta um risco grave, pois o vírus pode ser facilmente transmitido quando as agulhas não são trocadas entre a injeção de um animal PI e os suscetíveis. O animal PI pode ser saudável ou não apresentar sinais característicos da doença. Isto é particularmente relevante com a vacinação em massa, uma prática comum em caprinos (LOKEN, 2000).

## **2.5 Patogenia e Manifestações Clínicas**

Segundo Noronha (2003), os padrões clínicos da infecção pré-natal e pós-natal dentro do rebanho dependerão de vários fatores, tais como a idade do animal, estado imunológico, cepa do vírus infectante, o status reprodutivo e a ocorrência de infecções secundárias.

### *2.5.1 Infecção Aguda*

Cordeiros e animais adultos expostos experimentalmente ao BDV não apresentaram sinais clínicos evidentes, sendo observada febre por curto período e uma leve leucopenia, associados a uma curta viremia, detectável a partir do quarto dia pós-infecção. À necropsia observou-se áreas multifocais de pneumonia dos lobos apicais de ambos os pulmões e lesões intestinais discretas (THABTI et al., 2002). As infecções agudas são diagnosticadas sorologicamente usando soros pareados de um número representativo de ovinos. Isolados ocasionais de BDV têm mostrado febre alta, leucopenia profunda e prolongada, anorexia, conjuntivite, descarga nasal, dispnéia e diarreia, com 50% de mortalidade de cordeiros jovens (NETTLETON et al., 1998).

### 2.5.2 Infecção Fetal

Os principais sinais clínicos da BD são vistos após a infecção de ovelhas prenhes. Enquanto a infecção de ovelhas prenhes é subclínica ou leve, as consequências para o feto são sérias, o vírus se espalha rapidamente para a placenta e passa para o feto dentro de uma semana de infecção. A morte fetal pode ocorrer em qualquer fase da gravidez, mas é mais comum em fetos infectados no início da gestação (NETTLETON, et al., 1998; NETTLETON, 2008).

O resultado final da infecção fetal depende de vários fatores, incluindo a cepa e da carga viral, assim com da capacidade imunológica do feto. O fator mais importante, porém, é o estágio de desenvolvimento fetal em que a infecção ocorre. Infecção após 85 dias de gestação é suprida por um sistema imunológico fetal capaz de neutralizar e eliminar o vírus. Neste caso a morte fetal é rara e a maioria dos cordeiros nascem normais com anticorpos detectáveis (NETTLETON, 2008).

Infecção intra-uterina durante o início da gravidez pode causar morte fetal e abortos. Alternativamente, infecções durante a primeira metade da gestação pode resultar em cordeiros com tremores, ataxia, pelos eriçados, malformações cerebrais e crescimento retardado (BECHER et al., 1998). Até 50% de cordeiros infectados sobrevivem enquanto que uma proporção dos nascidos apresenta a doença e será reconhecido como 'hairy-shaker'. Clinicamente, cordeiros afetados têm uma pequena chance de sobrevivência (NETTLETON, 2008).

### 2.5.3 Infecção Persistente

Os vírus possuem mecanismos que garantem a sua disseminação e persistência em uma dada população, apesar da existência de série de mecanismos de defesa do organismo infectado. Considera-se um animal PI quando se obtém o isolamento viral a partir de duas coletas de sangue separadas, por no mínimo, três semanas (FLORES & SCHUCH, 2007).

A estratégia de sobrevivência de alguns vírus consiste em causar uma infecção persistente em seus hospedeiros para alcançar a persistência em uma população. Ao persistir em um indivíduo, esses vírus devem superar a resposta imune do hospedeiro. Respostas do tipo interferons do tipo I (IFN) ou alpha / beta interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) são um importante mecanismo de defesa contra infecções virais de células eucarióticas. Células infectadas por vírus sintetizam e

secretam IFN, este liga-se por meio de receptor na superfície celular das células infectadas bem como das não infectadas para induzir um estado antiviral (SCHWEIZER et al., 2006).

Os pestivírus se mantêm circulantes na população do hospedeiro por uma combinação de infecções transitórias e persistentes. Este tipo único de persistência é iniciada quando o biótipo de ncp invade o feto *in útero* no início de seu desenvolvimento. Fetos infectados podem desenvolver-se normalmente, mas a infecção persiste por toda a vida (SCHWEIZER et al., 2006; AMMARI et al., 2010 ).

Quando o feto sobrevive a uma infecção que ocorre antes do início da competência imunológica, ou seja, antes do sistema imune ter capacidade de montar uma resposta eficaz contra qualquer antígeno, culminando com a sua completa eliminação, eles nascem com uma viremia persistente (OIE, 2012).

Cordeiros PI são aparentemente normais e podem sobreviver por anos, mas correm o risco de desenvolver uma diarreia fatal e síndrome semelhante à doença das mucosas em bovinos PI com o vírus da BVD (NETTLETON, 2008). Os animais PI podem apresentar crescimento retardado, malformações congênitas ou ser aparentemente saudáveis e são mais susceptíveis a infecções secundárias (FLORES, 2007). Normalmente animais PI têm sêmen de má qualidade, altamente infeccioso e fertilidade reduzida (OIE, 2012).

## **2.6 Diagnóstico**

Deve-se suspeitar de infecção pelo BDV quando houver perdas embrionárias, abortos, malformações fetais, nascimento de animais fracos, morte perinatal, além do nascimento de animais com alterações neurológicas e no pelo (ABRAHAM et al., 1991).

Um dos métodos mais sensíveis para identificar BDV é o isolamento do vírus. A imunoperoxidase, imunofluorescência direta, imunohistoquímica e outras técnicas de cortes de tecido congelado bem como a detecção de antígeno, ELISA, RT-PCR e real-time RT-PCR também são valiosos métodos de identificação dos animais infectados com BDV. Anticorpos para o BDV são normalmente detectados em soros ovinos utilizando vírus neutralização ou ELISA, imunodifusão em gel de ágar também pode ser usado. Controle de soros de referência positivos e negativos devem ser incluídos em cada teste (OIE, 2012).

### 2.6.1 Isolamento Viral

O teste padrão de diagnóstico é o isolamento do agente em cultivos celulares seguido por identificação por imunofluorescência ou imunoperoxidase, pois a maioria das amostras é não-citopática (FLORES, 2007). No animal vivo, a melhor amostra para isolamento de *Pestivirus* é o sangue total (RADOSTITS et al., 2002). Baço, tireóide, timo, rins, cérebro, linfonodos e lesões no intestino são os melhores órgãos para o isolamento do vírus. O vírus também está presente em grande número nos placentomas, cotilédones e carúncula uterina de ovelhas infectadas cujo material foi abortado. O sêmen pode ser examinado para a presença de BDV, mas é fortemente citotóxico e deve ser diluído, normalmente, pelo menos, 1/10 em meio de cultura. O sangue é a amostra mais confiável para detecção de animais PI através do isolamento viral (HUSSIM & WOLDEHIWET, 1994; OIE, 2012). A presença de BDV em culturas de células é detectada por imunofluorescência ou por imunoperoxidase (HUSSIM & WOLDEHIWET, 1994).

A viremia é facilmente detectável em qualquer idade, exceto nos primeiros dois meses de vida, quando o vírus é mascarado pelo anticorpo colostrar, no entanto, o vírus pode ser detectado por PCR em leucócitos lavados durante este período. Apesar de detecção de vírus no sangue durante uma infecção aguda ser difícil, a viremia persistente deve ser confirmada por novos testes após um intervalo de pelo menos três semanas (OIE, 2012).

### 2.6.2 Detecção de Antígenos Virais

Como os métodos de isolamento viral requerem um período prolongado de tempo, os métodos de diagnóstico alternativos, como a imunistoquímica, estão ganhando importância por serem mais baratos, rápidos e sensíveis para o diagnóstico de pestivírus (SALIKI & DUBOVI, 2004).

Vários métodos têm sido utilizados para demonstrar antígeno viral no cérebro, tecido linfóide e sangue de animais PI. O teste mais amplamente utilizado para demonstrar antígenos de pestivírus em tecidos congelados e no sangue periférico é o teste de imunofluorescência (HUSSIM & Woldehiwet, 1994). Também é possível detectar o antígeno viral em biópsias de pele, por imunohistoquímica, e em animais acima de quatro anos, alguns dos quais se desenvolvem os baixos níveis de anticorpos anti-BDV (OIE, 2012).

A pesquisa de antígenos em sangue ou leucócitos utilizando o ELISA tem sido amplamente utilizada em bovinos e tem proporcionado excelentes resultados na detecção de animais PI, porém seu uso em ovinos ainda não é comum. No entanto, foi relatada a sua utilidade para detectar ovinos PI apesar de não detectar viremia transitória (Garcia-Pérez et al., 2009).

### 2.6.3 Testes Sorológicos

A sorologia é importante no monitoramento da introdução de BDV em um rebanho e para a retrospectiva investigação de novos surtos de BD. Individualmente o diagnóstico de BD pode ser considerado se anticorpos anti-BDV específicos são detectados após o desaparecimento dos anticorpos colostrais. Porém deve-se considerar que animais PI são imunotolerantes e anticorpo-negativos. Portanto, os testes sorológicos são de valor diagnóstico para estabelecer a falta de anticorpos em animais PI com o BDV e no estabelecimento da presença da doença em um rebanho. Em rebanhos endêmicos, os animais soronegativos devem ser testados para isolamento viral em cultura ou para a presença de antígeno viral. Os testes mais utilizados para a detecção de anticorpos anti-BDV são a vírusneutralização e teste ELISA (HUSSIM & WOLDEHIWET, 1994).

Existe extensa reatividade antigênica cruzada entre espécies de *Pestivirus*, que podem atravessar a barreira espécie hospedeira e infectar várias espécies animais, com exceção para o CSFV, aparentemente restrito a espécie suína. A aplicação de análises genéticas parece ser necessária como abordagem mais adequada para o diagnóstico diferencial a fim de resolver tais infecções cruzadas, que podem mascarar a definição das espécies de *Pestivirus* circulante (PRATELLI et al., 2001; GIANGASPERO & HARASAWA, 2004; WILLOUGHBY et al., 2006).

### 2.6.4 Detecção de ácidos Nucléicos

A detecção de ácidos nucleicos por meio da PCR surgiu no final dos anos 80, possibilitando uma nova forma de isolamento e identificação de genes, sem que houvesse a necessidade de sua clonagem celular. Através dessa técnica, é possível obter uma grande quantidade de DNA de uma região específica a partir de quantidades extremamente pequenas de

um DNA-molde. Devido a essa particularidade é que a técnica de PCR foi revolucionária na área de diagnóstico molecular, pois permite que a presença de determinado agente infeccioso possa ser diagnosticada de forma direta, através da identificação de seus genes, mesmo quando ele está presente em quantidades muito pequenas em determinado organismo hospedeiro (ROSSETTI, 2006).

Há diversos estudos publicados em RT-PCR para a detecção de *Pestivirus* em caprinos e ovinos a partir de sangue total, swabs, tecidos variados (intestinal raspado de mucosa, rim, fígado, pulmão, nódulos linfáticos, baço e timo), soro, fetos e em tanques de leite (FULTON et al., 1999; BERRIATUA et al., 2006; GARCÍA-PÉREZ, 2009, DEHKORD, 2011).

Os métodos de detecção dos ácidos nucleicos do RNA do genoma viral apresentam vantagens sobre o isolamento viral por sua sensibilidade e especificidade (RADOSTITS et al., 2002). Por natureza a RT-PCR pode detectar o vírus inativado, portanto, este ensaio pode detectar o vírus em amostras na qual não foi isolado. Esta propriedade da RT-PCR é uma grande vantagem para o diagnóstico de *Pestivirus* porque nem sempre é possível obter amostras frescas o suficiente para isolamento do vírus. A rapidez deste ensaio é outra vantagem, uma vez que dependendo do método de extração de RNA viral adotado os resultados podem ser obtidos no mesmo dia (URANO et al., 1998).

A RT-PCR mostrou-se mais sensível na detecção do vírus que o isolamento viral, especialmente quando há presença de anticorpos maternos na amostra (WILLOUGHBY et al., 2006). Em comparação com o isolamento viral a RT-PCR é muito mais rápida, especialmente se o biótipo em questão for não citopático, que é mais predominante naturalmente e que leva mais tempo para se propagar (ALANSARI et al., 1993). Podendo detectar sequências genômicas, independentemente da infectividade do vírus e, especialmente, se as amostras do vírus tenham sido frequentemente congeladas e descongeladas (ALANSARI et al., 1993).

Fatores como custo operacional, perícia técnica, manipulação de ácidos nucleicos são considerados na escolha do método quando comparado com os métodos padrões de isolamento viral (RADOSTITS et al., 2002). A PCR é um método sensível, mas é sujeito a falsos positivos devido a contaminações das amostras no momento da coleta ou no laboratório (BRODERSEN, 2004).

A sensibilidade da RT-PCR depende da capacidade para extrair, purificar e recuperar RNA da amostra, da eficiência da síntese de cDNA e desenho de *primers*. A variabilidade

elevada entre isolados de *Pestivirus* pode parcialmente explicar resultados inconsistentes, como resultados falsos negativos (HAMEL et al., 1995), por isso a seleção de *primers* apropriados é importante para detectar uma ampla gama de cepas virais (URANO et al., 1998), sendo recomendado o uso de *primers* degenerados que podem lidar com pequenas variações na sequência em áreas conservadas (HYNDMAN et al., 1998).

Vários autores têm descrito sistemas de detecção de BVD pela técnica de RT-PCR bastante sensíveis. A partir de amostras de sobrenadante de cultura celular, Hamel et al. (1995) detectaram até 0,1 TCID<sub>50</sub>/mL, enquanto que Zhang et al. (2011) obtiveram maior sensibilidade detectando até 10<sup>-4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL. Urano et al. (1998) observaram um limiar de detecção de 10<sup>1.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL a partir de sobrenadante de cultura celular, soro e órgãos. Lopez et al. (1991) obtiveram resultados positivos de ≤ 1TCID<sub>50</sub>/100µL a partir de soro artificialmente contaminados, enquanto que Pilz et al. (2005) amplificaram BVDV (10<sup>3.56</sup> TCID<sub>50</sub>) em *pools*, artificialmente contaminados, de soro sanguíneo de bovinos até a diluição de 1:160.

Diversas adaptações para a detecção de *Pestivirus* por RT-PCR têm sido relatadas. Como o uso da técnica para genotipagem, utilizando uma nested RT-PCR onde a primeira reação utiliza *primers* degenerados e uma segunda reação com *primers* específicos para identificação do biotipo viral (VILCEK & PATON, 2000; PRATELLI et al., 2001; WILLOUGHBY et al., 2006), utilização de uma única reação para a síntese e amplificação de cDNA (BAXI et al., 2006) e a técnica de RT-PCR em tempo real.

A reação de amplificação quantitativa em tempo real (qPCR), uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico e apesar de ser uma modalidade recente na biologia molecular, é grande sua aceitação pela comunidade científica sendo muito expressivo o número de trabalhos publicados que envolvem a técnica (MELO, 2006; GOMES, 2008). A qPCR apresenta vantagens sobre os ensaios convencionais, uma vez que a amplificação de um produto é monitorado a cada ciclo através do acompanhamento da fluorescência de corantes ou sondas, além de que elimina a necessidade de análise do produto de PCR após a reação diminuindo o risco de contaminação (LETELLIER & KERKHOF, 2003).

Letellier & Kerkhofs (2003) em estudo simultâneo de detecção e genotipagem de BVDV obtiveram de limite de detecção de 1.000 e 100 cópias de RNA para os genótipos I e II. Zhang et

al. (2011) obtiveram resultados semelhantes com o limite de detecção de 100 cópias de RNA em RT-qPCR sendo dez vezes mais sensível que a RT-PCR convencional.

A região 5'UTR é útil para a caracterização de espécies ou genótipos do *Pestivirus*, sendo a região mais utilizada para estudos filogenéticos, que darão suporte científico para a classificação de novos isolados de *Pestivirus* (GIANGASPERO & HARASAWA, 2004; WILLOUGHBY et al., 2006).

Nos ensaios de detecção de ácidos nucléicos precauções rigorosas devem ser tomadas para evitar a contaminação do DNA no sistema de ensaio, e controles rigorosos devem ser montados, pois pode gerar falsos positivos devido a contaminações das amostras no momento da coleta ou no laboratório (OIE, 2012).

## **2.7 Controle e Profilaxia**

O controle da BD baseia-se na identificação e eliminação de animais PI e na prevenção da infecção de ovelhas prenhes susceptíveis (NETTLETON et al., 1998). A principal estratégia preconizada para o controle do BD é evitar a exposição de ovelhas gestantes suscetíveis à BDV. A manutenção de um rebanho fechado e a realização de testes periódicos, além da realização de testes diagnósticos antes de introduzir novos animais no rebanho para garantir que eles estão livres de BDV também ajudam a manter um rebanho livre da doença (NETTLETON et al., 2008).

Nas fazendas livres de BD, essa condição pode ser mantida por medidas destinadas a prevenir a introdução da doença no rebanho. Animais reprodutores de reposição devem ser rastreados para assegurar que eles não são persistentemente infectados. Fêmeas recém-introduzidas devem ser mantidas separadas do resto do rebanho até o momento do parto (NETTLETON et al., 1998).

Alguns autores têm recomendado a exposição de reprodutores ao vírus antes da estação de monta, através do pastoreio em conjunto com animais PI, no entanto tem-se observado que esta situação pode não ser eficaz devido a animais não apresentarem soroconversão (HUSSIM & WOLDEHIWET, 1994; OIE, 2012). Cuidados também devem ser tomados para não transmitir o vírus iatrogenicamente, por exemplo, pela utilização de instrumentos contaminados. As vacinas de BVDV utilizadas em bovinos não conferem proteção cruzada para BDV e não são licenciadas



para uso em ovinos (LOKEN, 2000).

### 3 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A.; ORGAD,U.; RAPOPORT, E. MARCUS, S. First report of Border Disease in Israel and the isolation of the virus. **Isr.J.Vet. Med.** v. 46, p. 138-141, 1991.

ALANSARI, H.; BROCK, K.V.; POTGIETER, L.N.D. Single and double polymerase chain reaction for detection of bovine viral diarrhoea virus in tissue culture and sera. **J Vet Diagn Invest.** v. 5, p. 148-153, 1993.

AMMARI M, MCCARTHY FM, NANDURI B , PINCHUK LM. Analysis of Bovine Viral Diarrhoea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and noncytopathic biotype differences. **BMC Bioinformatics.** v. 11, Suppl 6, 2010.

BAKER J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BAXI, et al; A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhoea viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p.37-44, 2006.

BECHER, P.; ORLICH, M.; THIEL, H. Complete Genomic Sequence of Border Disease Virus, a Pestivirus from Sheep. **Clinics of North America.** v. 72, n. 6, p. 5165-5173, 1998.

BERRIATUA, E. et al. Flock-prevalence of border disease virus infection in Basque dairy-sheep estimated by bulk-tank milk analysis. **Veterinary Microbiology.** v. 118, p. 37-46, 2006.

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

BRODERSEN, B.W. Immunohistochemistry used as screening method for persistent bovine viral

diarrhea virus infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** v. 20, p. 85-93. 2004.

CASTRO, R.S.; SILVA, F.A.G.; FRUTUOSO, E.M.; NASCIMENTO, S.A. Anticorpos contra *Pestivirus* e *Herpesvirus* em caprinos leiteiros no Estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 46, n.5, p. 577-578, 1994.

DA SILVA, N., ZARDOYA, R., SANTURDE, G., SOLANA, A., CASTRO, J.M.. Rapid and sensitive detection of the bovine viral diarrhea virus genome in semen. **J. Virol. Meth.** v.55, p.209–218, 1995

DALIRI, M.; et al. Detection of bovine viral diarrhea virus in bovine sêmen diarrhea virus genome in semen. **Journal of Virological Methods** v.55, p. 209-218, 2007.

DEHKORDI, F.S. Prevalence study of Bovine Viral Diarrhea Virus by evaluation of antigen capture ELISA and RT-PCR assay in aborted Bovine, Ovine, Caprine, Buffalo and Camel fetuses in Iran. **AMB Express.** v.32, n. 1, 2011.

DONIS, R. Molecular biology of bovine viral diarrhea virus and its interactions with the host. **Veterinary Clinics of North America,** v. 11, p. 393-421, 1995.

DUBOIS, E., et al., Genetic characterization of ovine pestiviruses isolated in France, between 1985 and 2006, **Veterinary Microbiology.** v. 10 (1016), 2008.

FLORES, E.F.; SCHUCH, L.F.D. **Diarréia Viral Bovina.** In: Doença de Ruminantes e Equídeos. Riet-Correa, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. 3º Ed. Pallotti: Editora Santa Maria, 2007. v. 1, 81-93p.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária.** 1. ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007. v. 1. 888 p.

FLORES, E.F., WEIBLEN, R., VOGEL, F.S.F., ROEHE, P.M., ALFIERI, A.A., PITUCO, E.E.M., A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no Brasil - histórico, situação

atual e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 125-134, 2005.

GARCÍA-PE´REZ, A.L. et al. Detection of Border disease virus in fetuses, stillbirths, and newborn lambs from natural and experimental infections. **J Vet Diagn Invest**. v. 21, p.331–337, 2009.

GOMES, A.L.V. Desenvolvimento e Validação da Detecção Molecular da Infecção por *Schistosoma mansoni* em Lotes de Moluscos Vetores para Identificação de Focos de Transmissão. , 2008. 101p. Dissertação Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

GRAHAM, D. A et al. Comparative evaluation of diagnostic techniques for bovine viral diarrhoea virus in aborted and stillborn fetuses. **Veterinary Record**. v. 164, p. 56-58, 2009.

GIANGASPERO, M.; HARASAWA, R. Genetic Variety of Bovine viral diarrhea virus 2 strains isolated from sheep. **Virology**. v. 1, p.137-142.

HAMEL, A.L.; WASYLYSHEN, M.A.; NAYAR, G.S.; Rapid Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus by Using RNA Extracted Directly from Assorted Specimens and a One-Tube Reverse Transcription PCR Assay. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 33, n. 2, p. 287–291, 1995.

HECKERT, R.A.; DUBUC, C.; BRISCOE, M.R. RANGER, M. Prevalence of Border disease virus infection in a small group of Canadian sheep. **Can Vet J**. v. 35, 1994.

HYNDMAN, L.; VILCEK, S.; CONNER, J.; NETTLETON, P.F. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted bovine fetuses. **Journal of Virological Methods**v. v. 71, p. 69–76, 1998.

HUGHES, L.E.; KERSHAW, G.F.; SHAW, I.G. "B" or Border disease. An undescribed disease of sheep. *Vet Rec* 1959; 71:313-317. apud: LOKEN, T. Border Disease in Goats. In: Recent

Advances in Goat Diseases, Tempesta M. (Ed.). Disponível em: [HYPERLINK "http://www.ivis.org"](http://www.ivis.org)

HURTADO, A. et al.; Detection and quantification of pestivirus in experimentally infected pregnant ewes and their progeny. **Virology Journal**, v.6:189, p. 1-8, 2009.

HUSSIN, A.A.; WOLDEHIWET, Z. Border Disease Virus: A Review. **Veterinary Bulletin**. v.64, n.12, p 1131-1151., 1994

KEYVANFAR, H.; HEMMATZADEH, F.; KARGAR-MOAKHAR, R. A Serological Survey on Prevalence of Sheep Border Disease in Iran. **Arch.Razi Ins**. v. 50, p. 186-192, 1999.

KOSINOVA, E.; PSIKAL, I.; ROBESOVA, B.; KOVARCIK, K. Real-time PCR for quantitation of bovine viral diarrhoea virus RNA using SYBR Green I fluorimetry. **Veterinarni Medicina**. v. 52, n. 6, p. 253–261, 2007.

LETELLIER, C.; KERKHOF, P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. **Journal of Virological Methods**. v. 114, 21-27, 2003.

LINDBERG, A. L., Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. [HYPERLINK "javascript:AL\\_get\(this,%20'jour',%20'Vet%20Q.'\);" \o "The Veterinary quarterly."](#) **Vet Q**. v. 25, p. 1-16, 2003.

LOKEN, T. Border Disease in Goats. In: Recent Advances in Goat Diseases, Tempesta M. (Ed.). Disponível em: [HYPERLINK "http://www.ivis.org"](http://www.ivis.org)

LOPEZ, O.J.; OSORIO, F.A. DONIS, R.O., Rapid Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.3, p. 578-582.

MARTUCCIELLO, A. et al. Detection of Bovine viral diarrhoea virus from three water buffalo fetuses (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. **J Vet Diagn Invest.** v. 21, p. 137–140, 2009.

MELO, F.L. Desenvolvimento De Métodos Moleculares Baseados m P PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni*, 2006. 114p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

MENDEZ E, RUGGLI N, COLLETT MS, RICE CM. Infectious bovine viral diarrhoea virus (Strain NADL) RNA from stable cDNA clones: A cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. **J Virol.** v. 72, p. 4737– 4745, 1998

MEYERS, G., THIEL, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. **Adv. Vir. Res.** v. 47, p. 53–118, 1996.

NETTLETON, P.; GILRAY, J.A.; RUSSO, P.; DLISSI, E. Border Disease of sheep and goats. **Vet. Res.** v. 29, p. 327-340, 1998.

NETTLETON, P. 2008, Border Disease of sheep and goats. Disponível em: **HYPERLINK** "<http://www.moredun.org.uk/research/practical-animal-health-information/disease-summaries/border-disease>"

NORONHA, R.P.; CAMPOS G.S.; SARDIS.I. Pesquisa do vírus da diarréia viral bovina em bovinos jovens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v. 40, p. 424-430, 2003.

OIE – World Organization of Animal Helth - [http://www.oie.int/eng/en\\_index.htm\\_BorderDesease](http://www.oie.int/eng/en_index.htm_BorderDesease). Acessado em 15 de fevereiro de 2012.

PILZ, D.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarréia 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.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: **Infectious Diseases of Livestock**. 2 ed. v.2. Oxford University Press Southern África, Cape Town. pp 946-69. 2004.

PRATELLI, et al., Genomic characterization of pestiviruses isolated from lambs and kids in southern Italy. *Journal of Virological Methods*. v. 94, p. 81–85, 2001.

RADOSTITS, O.M.; GAY. C.; BLOOD. D.C.; HINCHCLIFF. K.W. **Diarréia viral bovina, doenças das mucosas, complexo doença pestivirus bovino**. In: *Clínica Veterinária: Um tratado de doenças de Bovinos, ovinos, suínas, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Editora: Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro,2002. p.974-993.

ROSSETTI, M.L., SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. Doenças Infeciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2006. p.16-39.

RUGGLI, N., BIRD, B.H., LIU, L., BAUHOFER, O., TRATSCHIN, J.D., HOFMANN, M.A.N(pro) of classical swine fever virus is an antagonist of double-stranded RNA-mediated apoptosis and IFN-alpha/beta induction. *Virology*. v. 340, n. 2, p. 265–276, 2005.

SALIKI, J.T.; DUBOVI. E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** v. 20, p. 69-83,2004.

SCHWEIZER, M.; MA"TZENER, P.; PFAFFEN, G. STALDER, H.; PETERHANS, E. "Self" and "Nonself" Manipulation of Interferon Defense during Persistent Infection: Bovine Viral Diarrhea Virus Resists Alpha/Beta Interferon without Blocking Antiviral Activity against Unrelated Viruses Replicating in Its Host Cells. **J. Virol.** v. 80, n. 14, p. 6926-6935, 2006.

SILVA, T.L.A. **Anticorpos anti-pestivirus em caprinos e ovinos do Sertão do Estado de**

**Pernambuco, Brasil.** 2009. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi Nested-PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 43-56, 2003.

THABTI, et al., Experimental model of Border Disease Virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. **Vet. Res.**v. 33, p. 35–45, 2002.

URUNO, k.; SHIBATA, I.; NAKANE, T.; Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) Using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 2, p. 287–291, 1998.

VALDAZO-GONZALEZ, B., ALVAREZ, M., WILKE, G. Genetic typing and prevalence of Border disease virus (BDV) in small ruminant flocks in Spain. **Veterinary Microbiology.** V. 117, p. 141–153, 2006.

VALDAZO-GONZÁLEZ, B., ÁLVAREZ, M., SANDVIK, T. Prevalence of border disease virus in Spanish lambs. **Veterinary Microbiology**, v. 128, p. 269–278, 2008.

Vilcek,S., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P.,Paton, D.J., Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Arch. Virol.** v. 136, p. 309–323, 1994.

VILCEK, S.; NETTLETON, P.F.; PATON, D.J. and BÉLAK S. Molecular characterization of ovine pestiviruses. **Journal of General Virology.** v.78, p.725-735, 1997.

Vilcek, S., Paton, D., Lowings, P., Bjorklund, H., Nettleton, P., Belak, S. Genetic analysis of



pestiviruses at the 3' end of the genome. **Virus Genes** v. 18, p. 107–114, 1999.

VILCEK, S., PANTON, D.J. A RT-PCR assay for the rapid recognition of border disease virus. **Vet. Res.** v. 31, p. 437–445, 2000.

WILLOUGHBY, K., VALDAZO-GONZALEZ , B., MALEY, M., GILRAY , J., NETTLETON, P.F. Development of a real time RT-PCR to detect and type ovine pestiviruses. **Journal of Virological Methods.** v. 132, p. 187–194, 2006.

ZHANG et al; Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. **Virology Journal**,v. 8 p.1-8, 2011.

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

---

**Determinação do Limite Mínimo de Detecção das Técnicas de RT-PCR e  
RT-qPCR para *Pestivirus***

---

## **Determinação do Limite Mínimo de Detecção das Técnicas de RT-PCR e RT-qPCR para *Pestivirus*<sup>1</sup>**

PEREIRA, D.S.\*<sup>2</sup>, GOMES, A.L.V.<sup>3</sup>, NASCIMENTO, S.A.<sup>4</sup>, MAIA, R.C.C.<sup>5</sup>, CASTRO, R.S.<sup>6</sup>

**ABSTRACT-** The Pestiviruses in ruminants are often associated with temporary and subclinical or mild clinical signs, with the largest losses related to the infection of pregnant females that can cause fetal loss and birth of persistently infected (PI) animals. The *Pestivirus* are distributed in many countries, including Brazil, where studies in goats and sheep are scarce. Several studies have reported the use of molecular techniques for the detection of *Pestivirus*, among them the RT-PCR and the RT-qPCR. They are able to detect PI animals, which are the main source of the virus-Care in the herd. The objective of this study was to determine the lower limit of detection for *Pestivirus* from supernatant cell culture and serum samples from small ruminants using RT-PCR and qRT-PCR. The extraction of nucleic acids was performed with a commercial kit QIAamp ® MinElute ® Virus Spin, the reverse transcriptase reaction followed the protocol recommended by the manufacturer of the enzyme reverse transcriptase M-MLV. The evaluation of the detection limit of RT-qPCR and RT-PCR was performed using a *Pestivirus* calibration curve (dilution factor 10) with known and decreasing TCID<sub>50</sub>/mL using primers called panpestivirus. The detection limit of RT-qPCR in supernatant cell culture was 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL and RT-PCR was 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, since the lower limit of detection using sera weeding, sheep and Gibco ® Lamb as a diluent were TCID<sub>50</sub>/mL. Tests conducted under the conditions described in this study proved to be sensitive and can be used as a strategy for etiologic diagnosis of *Pestivirus*, especially for the molecular identification of IP animals, which is essential for the control of Pestiviruses.

---

<sup>1</sup> Artigo submetido ao Periódico Pesquisa Veterinária Brasileira

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE, CEP: 52171-900 \*(\*) Autora para correspondência: E-mail: danieladasilva9@hotmail.com

<sup>3</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE, CEP: 52171-900 E-mail: analisagomes@gmail.com

<sup>4</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE, CEP: 52171-900 E-mail: pu7san@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE, CEP: 52171-900 E-mail: rccmaia@yahoo.com.br

<sup>6</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife-PE, CEP: 52171-900 E-mail: robertsoarescastro@gmail.com

INDEX TERMS: Pestiviruses, small ruminants, molecular diagnosis

**RESUMO** - Em ruminantes as pestiviroses são frequentemente associadas a infecções subclínicas ou com sinais clínicos leves e passageiros, sendo as maiores perdas relacionadas com a infecção de fêmeas prenhes que podem causar perdas fetais e nascimento de animais persistentemente infectados (PI). Os *Pestivirus* estão distribuídos em muitos países, inclusive no Brasil, onde estudos em caprinos e ovinos são escassos. Vários estudos tem relatado a utilização de técnicas moleculares para a detecção de *Pestivirus*, dentre elas a RT-PCR e a RT-qPCR que são capazes de detectar animais PI, principal fonte de manutenção do vírus no rebanho. Objetivou-se com este estudo determinar o limite mínimo de detecção para *Pestivirus* a partir de sobrenadante cultura celular e soro de pequenos ruminantes utilizando a RT-PCR e qRT-PCR. A extração dos ácidos nucléicos foi realizada com kit comercial QIAamp® MinElute® Virus Spin, a reação de transcriptase reversa seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante da enzima transcriptase reversa M-MLV. A avaliação do limite de detecção da RT-qPCR e RT-PCR para *Pestivirus* foi realizada utilizando uma curva de calibração (fator de diluição 10) com TCID<sub>50</sub>/mL conhecidas e decrescentes utilizando *primers* denominados panpestivírus. O limite de detecção da RT-qPCR em sobrenadante de cultura celular foi de 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL e da RT-PCR foi de 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, já o limite mínimo de detecção utilizando os soros caprino, ovino e Gibco® Lamb como diluentes foram de 1 TCID<sub>50</sub>/mL. Os ensaios realizados nas condições descritas nesse estudo demonstraram ser sensíveis, podendo ser utilizados como uma estratégia de diagnóstico etiológico do *Pestivirus*, sobretudo para a identificação molecular de animais PI, o que é essencial para o controle das pestiviroses.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Pestiviroses, pequenos ruminantes, diagnóstico molecular

## INTRODUÇÃO

As pestiviroses são reconhecidas como enfermidades responsáveis por perdas econômicas significativas em rebanhos bovino, caprino e ovino em todo o mundo (LINDBERG, 2003). Seus agentes etiológicos estão classificados na família *Flaviviridae* e são membros do gênero

*Pestivirus*. Três espécies de *Pestivirus* são reconhecidas: Vírus da Doença das Fronteiras (Border Disease Virus - BDV), Vírus da Diarréia Viral Bovina (Bovine viral diarrhea virus - BVDV) e Vírus da Peste Suína Clássica (Classical Swine fever vírus - CSFV) (RADOSTITS et al., 2002; POTGIETER, 2004).

Embora originalmente identificado a partir de casos de doença gastroentérica grave, os *Pestivirus* tem sido mais frequentemente associados às infecções subclínicas ou com sinais clínicos leves e passageiros. As maiores perdas estão geralmente relacionadas com a infecção de fêmeas prenhes. Os pestivirus têm a capacidade de atravessar a placenta e infectar o concepto, podendo causar mortalidade embrionária ou fetal, abortos ou mumificação fetal, malformações e nascimento de animais fracos e inviáveis, além de animais persistentemente infectados (PI). Os animais PI eliminam o vírus continuamente em grandes quantidades e constituem-se na principal fonte de disseminação do vírus (BAKER, 1995).

A profilaxia e o controle da infecção consistem fundamentalmente na identificação e remoção de animais PI das propriedades. Vários são os exames laboratoriais que auxiliam no diagnóstico definitivo, como o isolamento ou detecção de antígenos virais e ou a demonstração da resposta sorológica ao vírus (RADOSTITS et al., 2002; SALIKI & DUBOVI, 2004). Os métodos de diagnóstico molecular, particularmente a Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) estão sendo amplamente adotados para o diagnóstico etiológico de diversas viroses animais, inclusive das Pestivirose. As principais vantagens da abordagem molecular incluem a rapidez na obtenção dos resultados, a capacidade de detecção da presença viral em quantidade muito pequena de partícula viral e, quando devidamente padronizada, as altas taxas de sensibilidade e especificidade (VILCEK et al., 1994; TAKIUCHI et al., 2003).

Atualmente, os procedimentos sorológicos e isolamento do vírus são os métodos escolhidos para o diagnóstico de *Pestivirus*. No entanto, resultados sorológicos negativos devem ser interpretados com cautela, uma vez que animais PI são aparentemente saudáveis, soronegativos e com qualidade de sêmen aceitável. A detecção de *Pestivirus* pela amplificação RT-PCR torna-se assim uma boa alternativa aos testes convencionais.

Vários autores têm descrito sistemas de detecção de BVDV pela técnica de RT-PCR bastante sensíveis. A partir de amostras de sobrenadante de cultura celular, Hamel et al. (1995) detectaram até 0,1 TCID<sub>50</sub>/mL, enquanto que Urano et al. (1998) observaram um limiar de detecção 10<sup>1.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL a partir de sobrenadante de cultura celular, soro e órgãos.

O objetivo deste estudo foi determinar o limite mínimo de detecção da técnica de RT-qPCR e RT-PCR para *Pestivirus* a partir de sobrenadante de cultura celular e soro de pequenos ruminantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Vírus e células

A estirpe citopática Singer do BVDV mantida em células MDBK (Madin Darby bovine kidney) foi gentilmente cedida pela Dra. Silvia Inês Sardi - Laboratório de Virologia Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e foi utilizada como controle positivo. O cultivo celular de MDBK infectado com BVDV foi mantido em meio Dulbecco modificado (DMEM, Gibco BRL, EUA) livre de micoplasmas e vírus, contendo 55 mg/mL de gentamicina (Sigma® Co., EUA) e 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma® Co., EUA), suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, BRL, EUA).

### Titulação Viral

O título viral foi determinado por meio de um ensaio em microplacas (96 Well Cell Culture Cluster, CORNING). Para tanto, a amostra do vírus foi descongelada e mantida em banho de gelo. Foi realizada a diluição logarítmica de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  em DMEM da amostra viral. Volumes de 50µL de DMEM acrescido de 2% de SFB foram aplicados nos poços da microplaca em seguida igual volume das diluições seriadas do vírus foram adicionadas. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora. Após incubação foi adicionado à placa a suspensão celular de MDBK na concentração de  $4 \times 10^5$  células /mL no volume de 50µL em cada poço. As duas últimas colunas da placa serviram de controle de vírus e controle celular. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 96 horas, os poços apresentando efeito citopático foram identificados. O título viral foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938).

Para a curva padrão a partir de DMEM foram utilizadas as diluições logarítmica de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  da amostra viral, obtendo-se de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  TCID<sub>50</sub>. Para a curva padrão a partir de soro foram utilizadas as diluições logarítmica de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  da amostra viral, obtendo-se de  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  TCID<sub>50</sub>. Utilizando pools de soros caprino e ovino, oriundos do rebanho do Departamento de

Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pernambuco e soro comercial Gibco® Lamb (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) negativo para o vírus em estudo, como diluentes.

#### Extração do RNA viral

A extração do Ácido Nucléico viral foi realizada por meio do Kit comercial QIAamp® MinElute® Virus Spin (Quiagen, Alemanha, 2011), segundo as instruções do fabricante.

#### Transcrição Reversa – RT

Para a realização da RT foi seguido o protocolo recomendado pelo fabricante da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen™, Life Technologies, EUA). Preparou-se o mix I com 1 µL do RNA extraído, 2 pmole de *primer* 326 R (Quiagen, Alemanha, 2011), 1 µL de dNTP's a 0,1 mM (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) e 6 µL água ultrapura (MilliQ®) autoclavada completando o volume final de 9 µL. Um mix II foi preparado com 4 µL de 5xRTbuffer (Invitrogen™, Life Technologies, EUA), 1 µL de DDT (Invitrogen™, Life Technologies, EUA), 2 µL (200 U) da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen™, Life Technologies, EUA).

A síntese do cDNA foi realizada em termociclador, o mix I foi incubado sob as condições de temperatura e tempo: i) 65°C / 5min, ii) gelo por 2 min. Centrifugado em centrífuga Mini Spin® brevemente. Adicionado do mix II, pipetando gentilmente. Posteriormente incubado em termociclador sob as condições de temperatura e tempo: i) 25°C / 5min, ii) 50°C / 45 min, iii) 70°C / 15 min, iv) 50°C / 0 min. Ao término o cDNA foi mantido a -20°C até o uso.

#### qPCR

A amplificação dos fragmentos de cDNA de *Pestivirus* foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Quiagen, Alemanha, 2011) e um par de *primers* 324 / 326, denominado panpestivírus (Vilcek et al., 1994). Foi preparada uma solução contendo 5 µL de cDNA e 12,5 µL de 2x QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, 2 µL a 10 pmol de cada *primer* (324 / 326) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada nas seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 95°C/5min, ii) 35 ciclos de 95°C/10s, 60°C/30s. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

#### PCR

A amplificação dos fragmentos de cDNA de *Pestivirus* foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante da Top Taq Master Mix (Quiagen, Alemanha, 2011). Foi preparada uma solução contendo 5 µL de cDNA e 25 µL de Top Taq Master Mix, 4 µL a 10 pmol de cada *primer* (324 / 326) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura: i) uma etapa de 94°C/3min, ii) 35 ciclos de 94°C/30 min, 60°C/30s e 72°C/30s e iii) uma etapa de extensão final por 72°C/ 10min.

#### Eletroforese

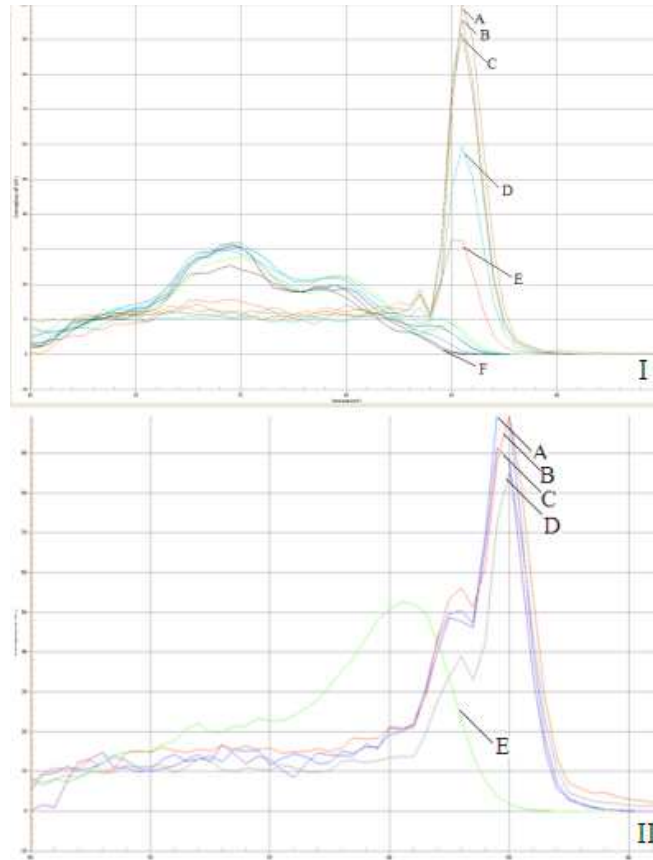
Os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% com coloração pelo Blue green Loading dye I (LGC Biotecnologia, SP, BR). As bandas de DNA separadas eletroforeticamente foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com um sistema de captura de imagem L-PIX-HE (Loccus Biotecnologia, Loccus do Brasil Ltda).

### RESULTADOS

O método de extração utilizado, QIAamp® MinElute® Virus Spin, a transcrição reversa, a RT-qPCR e RT-PCR mostraram-se ser adequados, gerando produtos com tamanho molecular esperado, de forte intensidade na amplificação do controle positivo e ausência de produtos inespecíficos ou de sinais de degradação do ácido nucléico.

As amostras utilizadas como controles positivos foram positivas para a reação, quando avaliados tanto a amplificação como a curva de *melting*. As amostras positivas apresentaram maior fluorescência na curva de amplificação. No gráfico de dissociação (utilizando a derivada da fluorescência gerada), as amostras positivas tiveram uma temperatura de *melting* (TM) entre 85,5 e 86°C (Figura 1).





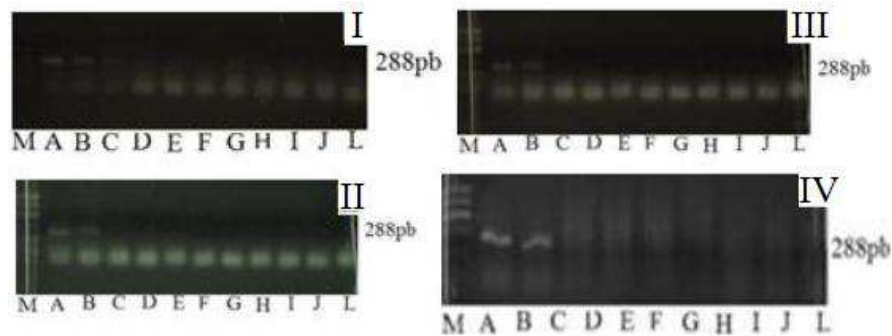
**Figura 1. I:** Curva de dissociação de sobrenadante de cultura celular (temperatura de *melting* foi de 86 °C). A: controle positivo; B: 1 TCID<sub>50</sub>/mL; C: 10<sup>-1</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; D: 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; E: 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; F: controle negativo. **II:** Curva de dissociação de soros caprino, ovino e Gibco® Lamb (temperatura de *melting* foi de 85,5 °C) A: controle positivo; B: 1 TCID<sub>50</sub>/mL soro caprino; C: 1 TCID<sub>50</sub>/mL soro ovino; D: 1 TCID<sub>50</sub>/mL soro Gibco® Lamb; E: controle negativo.

A reação de RT-PCR utilizando o par de *primers* denominados panpestivírus (Vilcek et al., 1994), resultaram na amplificação de produtos com fragmentos de 288pb que foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% com coloração pelo Blue green Loading dye I, representadas pelas figura 2.

A avaliação do limite de detecção da RT-qPCR para *Pestivirus* foi realizada utilizando uma curva de calibração (fator de diluição 10) com TCID<sub>50</sub>/mL conhecidas. A figura 1 mostra as curvas de dissociação obtidas para quantidades conhecidas e decrescentes de TCID<sub>50</sub>/mL de *Pestivirus*. Observa-se a amplificação de fragmentos de um mesmo tamanho devido à presença de um pico observado entre 85,5°C e 86°C correspondente à temperatura de *melting* do produto de amplificação. O limite de detecção de *Pestivirus* em sobrenadante de cultura celular foi de 10<sup>-3</sup>

TCID<sub>50</sub>/mL (Figura 1 II), já o limite mínimo de detecção utilizando os soros caprino, ovino e Gibco® Lamb como diluentes foram de 1 TCID<sub>50</sub>/mL (Figura 1 II).

A avaliação do limite de detecção da RT-PCR para *Pestivirus* foi realizada utilizando uma curva de calibração (fator de diluição 10) com TCID<sub>50</sub>/mL conhecidas e decrescentes. A figura 2 mostra a amplificação de produtos de aproximadamente 288 pb. O limite de detecção de *Pestivirus* em sobrenadante de cultura celular foi de 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL (figura 2.I), quando utilizado soro caprino, ovino e Gibco® Lamb como diluentes foram de 1 TCID<sub>50</sub>/mL representados nas figura 2.



**Figura 2.** Produtos de RT-PCR para *Pestivirus* em gel de agarose a 2% com Blue green Loading dye I. M: marcador de peso molecular GelPilot 100 bp Ladder Qiagen; A: controle positivo; B: 1 TCID<sub>50</sub>/mL; C: 10<sup>-1</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; D: 10<sup>-2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; E: 10<sup>-3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; F: 10<sup>-4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; G: 10<sup>-5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; H: 10<sup>-6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; I: 10<sup>-7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; J: 10<sup>-8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL; L: controle negativo I: Produtos amplificados a partir de sobrenadante de cultura celular. II, III e IV: Produtos amplificados a partir de soro caprino, Gibco® Lamb e ovino, respectivamente.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A detecção de vírus de forma rápida por técnicas confiáveis ainda é uma das tarefas mais exigentes em diagnóstico veterinário (BAXI et al., 2006). O desenvolvimento e aprimoramento dos métodos moleculares têm melhorado a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico das doenças infecciosas através da detecção do ácido nucléico do agente etiológico. O controle de *Pestivirus* se dá principalmente pela identificação e eliminação de animais PI, o que é possível através das técnicas de RT-PCR e RT-qPCR.

Detecção de RNA viral tem várias vantagens sobre ensaio de detecção de antígenos, dentre eles à falta de interferência de anticorpos virais específicos na amostra e a alta

sensibilidade de RT-PCR, além da rapidez na emissão de resultados (BAXI et al., 2006; LA ROCCA & SANDVIK, 2009). Entre as técnicas de detecção de ácidos nucléicos a qPCR apresenta vantagens sobre a PCR convencional, pois diminui o risco de contaminação, uma vez que dispensa a manipulação dos produtos de PCR para visualização em corridas eletroforéticas em gel e a sensibilidade analítica é ao menos 1000 vezes superior aos ensaios de PCR (GOMES, 2008).

Neste estudo, optou-se por utilizar primers desenhados a partir da região 5'-UTR, por esta ser uma região bem conservada do genoma viral entre as espécies de *Pestivirus*. Sendo então utilizados os primers denominados panpestivirus (VILCEK, et al., 1994) que amplificaram 288pb.

Nosso ensaio RT-PCR foi capaz de detectar  $10^{-2}$  TCID<sub>50</sub>/mL de *Pestivirus* em sobrenadante de cultura celular, sendo mais sensível que o ensaio desenvolvido por Hamel et al. (1995) e Urano et al. (1998), logo nosso ensaio de RT-PCR parece ser sensível suficiente para diagnosticar *Pestivirus*. O limite de detecção da qRT-PCR foi de  $10^{-3}$  TCID<sub>50</sub>/mL, 10 vezes mais sensível que a RT-PCR, o que comprova que a qRT-PCR é uma técnica mais eficiente com um limite de detecção inferior e superior sensibilidade analítica (GOMES, 2008).

Na técnica de RT-PCR e RT-qPCR em amostras constituídas de soro caprino, ovino e Gibco® Lamb contaminadas artificialmente, nosso ensaio foi capaz de detectar 1 TCID<sub>50</sub>/mL, demonstrando ser mais sensível que o ensaio realizado por Lopez et al. (1991) e Gilbert et al. (1997) em ensaio realizado com sangue total. A menor sensibilidade do ensaio utilizando soro como material clínico para detecção do RNA de *Pestivirus* pode ser justificada devido à presença de inibidores da PCR, tais como proteínas séricas que podem impedir o acesso das polimerases ao DNA alvo (WILSON, 1997).

A RT-PCR e a RT-qPCR utilizando os primers descritos por VILCEK et al. (1994), realizadas nas condições descritas nesse estudo demonstraram ser ensaios sensíveis, podendo ser utilizado como uma estratégia de diagnóstico etiológico do Pestivirus capaz de proporcionar resultados conclusivos em curto período de tempo. Sendo esta uma grande vantagem quando se deseja um resultado rápido, como em um surto da doença em um rebanho. Além de que os ensaios de RT-PCR e RT-qPCR serem adaptáveis para o uso a campo, contribuindo para uma identificação molecular de animais PI atuando assim como importante ferramenta no controle das pestiviroses.

**Agradecimentos** – Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo financiamento (Processo 578341/2008-5, Edital MCT/CNPq/MAPA/SDA nº64/2008), À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa. Ao LANAGRO-Recife e a Professora. Dra. Silvia Inês Sardi pelas amostras concedidas.

### REFERÊNCIAS

BAKER J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. **Veterinary Clinics of North America**, v. 11, n. 3, p. 425-445, 1995.

BAXI, et al; A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 116, p.37–44, 2006.

GILBERT, S.A.; BURTON, K.M.; PRINS, S.E; DEREGT, D. Typing of Bovine Viral Diarrhea Viruses Directly from Blood of Persistently Infected Cattle by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 6, p. 2020–2023, 1999.

GOMES, A.L.V. Desenvolvimento e Validação da Detecção Molecular da Infecção por *Schistosoma mansoni* em Lotes de Moluscos Vetores para Identificação de Focos de Transmissão. , 2008. 101p. Dissertação Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

HAMEL, A.L.; WASYLYSHEN, M.A.; NAYAR, G.S.; Rapid Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus by Using RNA Extracted Directly from Assorted Specimens and a One-Tube Reverse Transcription PCR Assay. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 33, n. 2, p. 287–291, 1995.

LA ROCCA, S.A., SANDVIK, T A. short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. **Journal of Virological Methods**, v.161, p. 122–127, 2009.

LINDBERG, A. L., Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. HYPERLINK "javascript:AL\_get(this,%20'jour',%20'Vet%20Q.');" \o "The Veterinary quarterly." **Vet Q.** v. 25, p. 1-16, 2003.

LOPEZ, O.J.; OSORIO, F.A. DONIS, R.O., Rapid Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.3, p. 578-582.

POTGIETER, L.N.D. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. In: **Infectious Diseases of Livestock**. 2 ed. v.2. Oxford University Press Southern África, Cape Town. pp 946-69. 2004.

RADOSTITS, O.M.; GAY. C.; BLOOD. D.C.; HINCHCLIFF. K.W. Diarréia viral bovina, doenças das mucosas, complexo doença pestivirus bovino. In: *Clínica Veterinária: Um tratado de doenças de Bovinos, ovinos, suínas, caprinos e eqüinos*. 9 ed. Editora: Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro,2002. p.974-993.

SALIKI, J.T.; DUBOVI. E.J. Laboratory diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infections. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** v. 20, p. 69-83,2004.

TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Otimização da reação em cadeia pela polimerase (Semi Nested-PCR) para a detecção do herpesvírus bovino tipo 1 em fragmentos de órgãos fetais e em sêmen de bovinos naturalmente infectados. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, p. 43-56, 2003.

URANO, k.; SHIBATA, I.; NAKANE, T.; Detection of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) Using Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. **J Clin Microbiol.** v. 33, n. 2, p. 287-291, 1998.

VILCEK,S., HERRING, A.J., HERRING, J.A., NETTLETON, P.F., LOWINGS, J.P.,PATON, D.J., Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **Arch. Virol.**

v. 136, p. 309–323, 1994.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3741-3751, 1997.

Zhang et al; Development of one-step SYBR Green real-time RT-PCR for quantifying bovine viral diarrhea virus type-1 and its comparison with conventional RT-PCR. **Virology Journal**, v. 8 p.1-8, 2011.