

Sobral, CE, Brasil.

E-mail: rizado@cnpq.embrapa.br

<sup>2</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, CE, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

<sup>4</sup>Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa, Fortaleza, CE, Brasil.

### Diagnóstico de vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras de sêmen por RT-PCR convencional e cinética

*Diagnosis of bovine viral diarrhea virus (BVDV) in semen samples by conventional and RT-PCR and real time*

Gasparini, M.R.<sup>1,2</sup>; Carvalho, I.L.Q.<sup>1</sup>; Oliveira, A.P.<sup>2</sup>; Barbosa, A.A.S.<sup>1</sup>; Leite, R.C.<sup>2</sup>; Barbosa-Stancioli, E.F.<sup>1</sup>

O vírus da diarreia viral bovina (BVDV) é um importante patógeno que infecta rebanhos bovinos do mundo inteiro, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *Pestivirus*. A infecção por BVDV pode causar problemas gastrointestinais, respiratórios e reprodutivos, com conseqüente prejuízo para a pecuária nacional. Nesse contexto, destaca-se a infecção uterina gerando animais persistentemente infectados (PI), responsáveis pela manutenção do vírus nos rebanhos. Circulam nos rebanhos dois genótipos do BVDV (BVDV-1 e BVDV-2), pertencentes a dois biótipos (amostras citopatogênicas – CP – ou não citopatogênicas – NCP), dependendo do efeito em cultura celular, com diferentes graus de virulência. O sêmen de animais infectados se destaca como forma de transmissão viral na inseminação artificial (IA), monta natural ou pela transferência de embrião, sendo preconizada pela OIE a testagem do sêmen. O objetivo deste trabalho foi a padronização de um teste de PCR sensível e específico para o diagnóstico do BVDV em sêmen bovino. O BVDV-1 (ATCC NADL), expandido em células MDBK (CCL-22, ATCC) e cultivadas com 10% de soro fetal equino, foi utilizado para a extração do RNA total com Tri-reagente segundo as instruções do fabricante. Inicialmente, produziu-se cDNA utilizando o kit Improm II (Promega®), seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se iniciadores específicos que ancoram na região 5'UTR (290 pb), região conservada dos *Pestivirus*. O *amplicon* foi clonado em vetor plasmidial pGEM-T-easy seguido de sequenciamento para a confirmação da especificidade do teste. A sensibilidade do teste foi aferida com o plasmídeo diluído na base 10, tendo sido a detecção observada até 44 fentogramas. Em seguida, o teste foi repadronizado em passo único (RT-PCR) para aumentar a sua rapidez e eficiência, utilizando-se um kit. Foram testadas 12 amostras clínicas de sêmen bovino provenientes de um único rebanho, tendo apresentado 83,3% de positividade (10/12). O passo seguinte foi a padronização da PCR para o sistema cinético (PCR em tempo real). O plasmídeo produzido foi então linearizado com o enzima de restrição Sal I e purificado do gel. A PCR foi padronizada com o uso do corante *Syber Green*, e os resultados mostraram um *slope* -3,341 e eficiência de 99,194%. Tanto o teste de PCR convencional quanto o de PCR cinético desenvolvidos mostraram-se eficientes para o diagnóstico do BVDV em sêmen, destacando-se o seu uso em programas de controle.

\*Instituição financiadora: CNPq / Mapa, Capes, Fapemig.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil. E-mail: marcelagasparini@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Diagnóstico de herpesvírus bovino (BoHV-1 e BoHV-5) em sêmen

*Diagnosis of bovine herpesvirus (BoHV-1 and BoHV-5) in semen*

Gasparini, M.R.<sup>1,2</sup>; Carvalho, I.L.Q.<sup>1</sup>; Oliveira, A.P.<sup>2</sup>; Barbosa, A.A.S.<sup>1</sup>; Leite, R.C.<sup>2</sup>; Barbosa-Stancioli, E.F.<sup>1</sup>

Os herpesvírus bovinos pertencem à família *Herpesviridae*, tendo como característica principal o estabelecimento de latência com posterior reativação viral causada por fatores como estresse e uso de corticoide. Devido a essa capacidade, os animais infectados eliminam vírus de maneira intermitente em excreções e secreções corpóreas, necessitando-se de ferramentas diagnósticas sensíveis e específicas para os programas de controle. Os herpesvírus bovinos apresentam distribuição mundial, tendo grande importância econômica para a pecuária brasileira, destacando-se o Herpesvírus Bovino 1 (BoHV-1), causador da rinotraqueite infecciosa bovina (IBR) e balanopostite e vulvovaginite pustular infecciosa (IPB/IPV), e o Herpesvírus bovino 5 (BoHV-5), que cocircula nos rebanhos juntamente com o BoHV-1, induzindo quadros de encefalite, além de quadros respiratórios e reprodutivos. Devido à importância crescente da inseminação artificial no Brasil, e sendo o sêmen uma via de transmissão importante, este trabalho tem como objetivo a elaboração de um teste diagnóstico molecular rápido e específico para a detecção do BoHV-1 e BoHV-5 em sêmen bovino. Amostras virais padrão foram cultivadas em células CRIB e o DNA total foi extraído com Tri-reagente segundo instruções do fabricante. Padronizou-se uma PCR utilizando iniciadores para a amplificação do gene viral codificador da glicoproteína G (495pb para BoHV-1.1, 1.2 e 531pb para BoHV-5) e do gene normalizador GAPDH (97pb). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e observaram-se *amplicons* nos tamanhos moleculares esperados para cada gene. Foi produzido um plasmídeo contendo os genes viral e normalizador e os insertos foram conferidos por sequenciamento gênico. A PCR foi então repadronizada como duplex (gG + GAPDH) com sucesso, variando-se condições de extringência e de concentração dos iniciadores para os dois distintos genes. O teste mostrou alta sensibilidade (detecção de 400 fentogramas de inserto) e a especificidade foi avaliada com outros herpesvírus animais e humanos pertencentes à mesma família, tendo amplificado somente BoHV-1 e BoHV-5. A PCR duplex desenvolvida foi utilizada com sucesso em amostras clínicas de sêmen bovino provenientes de um rebanho de animais soropositivos para BoHV-1 e BoHV-5, evidenciando o seu uso para triagem de sêmen.

\*Instituição financiadora: CNPq / Mapa, Capes, Fapemig.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil.

E-mail: marcelagasparini@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, Brasil.

### Vaccinia virus: presença de DNA viral no leite de vacas experimentalmente infectadas

*Vaccinia virus: presence of viral DNA in Milk of experimental infected cows*

Oliveira, T.M.L. DE<sup>1</sup>; Rehfeld, I.S.<sup>1</sup>; Matos, A.C.D.<sup>1</sup>; Rivetti Junior, A.V.<sup>1</sup>; Guedes, M.I.M.C.<sup>1</sup>; Abrahão, J.S.<sup>2</sup>; Kroon, E.G.<sup>2</sup>; Lobato, Z.I.P.<sup>1</sup>