

the world. Recently, human cases have been described. In Brazil, outbreaks of these parasites have been reported in several states from north to south. The differential diagnosis is not efficient and there is no differential field test to be used. Thus using the proteomic approach, we began the study of proteins differentially expressed in each of the parasites. The aim of this study is to identify proteins expressed by *T. evansi* trypomastigotes in mouse experimental infections, with emphasis in the identification of potential drug targets and differential diagnostic antigens. In a preliminary proteomic survey using LC/MS/MS, 33 proteins from *T. evansi* trypomastigotes were identified and assigned to COG functional groups, with most of them belonging to the group of cellular processes and signaling and metabolism proteins. Among the identified proteins there were cyclophilin and cysteine peptidase, which have been described as virulence factors and potential drug targets in other trypanosomatids, for being involved in parasite growth and survival in mammalian hosts. Furthermore, we identified several glycolytic enzymes, such as ATP-dependent phosphofructokinase, enolase and glycosomal fructose-bisphosphate aldolase. In *T. evansi* these enzymes are especially important for flagellar movement, a process that is dependent of the environmental glucose concentration. Considering that flagellar movement is essential for parasite infection, glycolytic enzymes also become attractive targets for future studies on their drug target potential. The *T. evansi* proteomic survey will also be extended with the analysis of more trypomastigote samples by both LC/MS/MS and 2DE-MALDI-MS/MS, in order to provide a comprehensive coverage of the repertoire of proteins expressed by this stage of the parasite. For the identification of antigenic proteins with potential for use in “surra” immunodiagnosis, we will also perform 2DE-immunoblots with sera from animals infected with *T. evansi* trypomastigotes.

Supported by: CNPq, Finep and Fapesp.

\*Fellowship from CNPq.

<sup>1</sup>Universidade do Estado de Santa Catarina, Laboratório de Bioquímica de Hemoparasitas e Vetores, Av Luiz de Camões, 2090, CEP 88520-000, Lages, SC, Brasil.

E-mail miletti@cav.udesc.br

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional, Porto Alegre, RS, Brasil.

### Detecção de polimorfismos do gene da proteína priônica no rebanho ovino nacional: métodos e aplicabilidade à seleção para resistência ao Scrapie\*

Detection of polymorphism of the prion protein gene in national sheep flock: method and applied for selection and resistance to Scrapie

Santos, C. R.<sup>1</sup>; Mori, E.<sup>2</sup>; Leão, D. A.<sup>3</sup>; Maiorka, P. C.<sup>1</sup>

Scrapie ou paraplexia enzoótica dos ovinos é uma doença neurodegenerativa fatal que acomete ovinos e raramente caprinos. O agente causador é chamado de príon (PrP<sup>Sc</sup>), uma forma alterada da proteína priônica normal (PrP<sup>C</sup>). A PrP<sup>C</sup> está presente na membrana celular de diversas células dos animais, principalmente no SNC. A infecção pelo PrP<sup>Sc</sup> pode ocorrer mais comumente por três formas: hereditariedade, consumo de alimentos oriundos de animais portadores da PrP<sup>Sc</sup> ou por eventuais polimorfismos. Os polimorfismos ocorrem nos códons 136, 154 e 171 do gene PRNP, que é o responsável pela síntese da proteína priônica. Os animais podem ser susceptíveis ou resistentes, de acordo com as

seqüências alélicas observadas nos referidos códons. São considerados altamente susceptíveis ao scrapie, animais que apresentem no seu genótipo a combinação VRQ para o gene PRNP, independente do outro alelo. São considerados como susceptíveis ao scrapie, ovinos que apresentem no seu genótipo a combinação alélica ARQ, AHQ, ou ARH para o gene Prnp. São considerados resistentes ao desenvolvimento de scrapie os ovinos que apresentem no genótipo dois alelos ARR. No Brasil, ocorreram apenas casos de animais que foram importados, sendo o País considerado livre da doença. Neste trabalho, foi realizada a genotipagem dos diferentes polimorfismos associados ao desenvolvimento do Scrapie e a categorização em animais susceptíveis e resistentes. Foram sequenciadas 118 amostras provenientes de ovinos nacionais da raça Santa Inês. Dessas amostras, foram identificados seis alelos e 11 genótipos (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/VRQ, AHQ/AHQ, ARR/ARR, ARR/AHQ, VRQ/VRQ, ARQ/TRQ, TRR/TRR, TRQ/TRQ), dentre os quais o genótipo ARQ/ARQ teve prevalência de 56,7%. Apenas 1,69% das amostras analisadas possuem o genótipo ARR/ARR, considerado resistente à doença. Em nove amostras, pôde ser observada a presença da Tirosina no códon 136, culminando com os seguintes genótipos: A/T e T/T. Até o presente momento, esses polimorfismos só foram descritos em publicações internacionais e são considerados como observações raras. Esse é o primeiro relato nacional e o primeiro relato envolvendo a raça Santa Inês. O efeito na susceptibilidade ou resistência nos animais portadores da homozigose T/T no códon 136 ainda não está totalmente elucidada, já a heterozigose A/T não altera a susceptibilidade à doença. Esses resultados apresentam grande variabilidade genética relacionada à raça Santa Inês e a baixa frequência do alelo ARR no rebanho nacional demonstra que programas de melhoramento genético envolvendo a raça Santa Inês devem ser adotados para aumentar a resistência ao desenvolvimento da doença.

\*CNPQ Edital: 064/2008

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Patologia, Laboratório de Neuropatologia Experimental e Comparada, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: caio-patologia@usp.br

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Cirurgia, São Paulo, SP, Brasil.

### Determinação de microorganismos responsáveis pela deterioração em carnes refrigeradas embaladas a vácuo\*

Determination of microorganisms responsible for deterioration in vacuum packed chilled meat

Fornazari, A. C. Z.<sup>1</sup>; Contreras-Castillo, C. J.<sup>1</sup>; Porto, E.<sup>1</sup>; Macedo, M. L. H.<sup>2</sup>; Junqueira, V. C. A.<sup>3</sup>; Kabuki, D. Y.<sup>4</sup>

O estufamento de embalagens a vácuo de carnes refrigeradas, também conhecido como *blown pack*, é atribuído a bactérias psicrófilas e psicrotólicas, dentre as quais fazem parte algumas espécies de clostrídios e enterobactérias. Essa deterioração é caracterizada pela intensa distensão da embalagem, levando à produção de gases e odores desagradáveis. O objetivo deste trabalho

foi avaliar a presença dos principais microorganismos envolvidos na deterioração tipo *blown pack*, com ênfase nas famílias de clostrídio e enterobactéria. Foram analisadas 13 amostras de carnes, bovinas refrigeradas embaladas a vácuo e estufadas, provenientes de frigoríficos dos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Goiás. Os cortes utilizados para as análises foram contrafilé, músculo, alcatra, picanha e filé de costela. As amostras apresentavam características de deterioração tipo *blown pack* dentro da data de validade, com períodos de armazenamento variando de 30 a 120 dias. Foram realizadas análises convencionais de cultivo visando ao isolamento de *Clostridium estertheticum* nas amostras de carne e identificação dos isolados obtidos pela técnica de PCR. Para o isolamento de enterobactérias, foram realizadas análises convencionais de microbiologia e para identificação dos microorganismos viáveis e cultiváveis nas amostras foi utilizado o kit API 20 E. As espécies de enterobactérias cultivadas e identificadas foram *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter braakii*, *Pantoea* sp. e *Yersinia enterocolitica*, sendo essa última potencialmente patogênica e de interesse em saúde pública. Observou-se que dentre as espécies de enterobactérias identificadas, a *H. alvei* foi predominante nas amostras avaliadas e não houve detecção de *C. estertheticum* nas amostras de carne.

\*MCT/CNPq/Mapa nº 64/2008 - Ações de defesa agropecuária - Linha 2 - Projetos de Pesquisa Científica Tecnológica e Inovação.

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Av. Pádua Dias, 11, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil.

E-mail: annaari@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade de São Paulo, CENA, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Piracicaba, SP, Brasil.

### Diagnóstico, caracterização molecular e estudos da patogenia de agentes infecciosos de importância econômica para a suinocultura brasileira\*

*Diagnostic, molecular characterization and pathogenesis studies of infectious agents of economical importance for the Brazilian swine production*

Ciacchi-Zanella, J. R.<sup>1</sup>; Schaefer, R.<sup>1</sup>; Klein, C. S.<sup>1</sup>; Silva, V.S.<sup>1</sup>; Caron, L.<sup>1</sup>; Piovezan, U.<sup>2</sup>

A agricultura e pecuária são setores essenciais para a economia do Brasil. Nesse cenário, os altos índices de produtividade e volume de exportações da suinocultura brasileira têm destaque mundial. Considerando-se os fatores de produção, as doenças infecciosas são as maiores ameaças à estabilidade das cadeias produtivas. Portanto, a disponibilização de ferramentas de diagnóstico alavancam pesquisas de etiologia, caracterização molecular, epidemiologia e controle de problemas sanitários em rebanhos suínos. O objetivo deste trabalho foi o de oferecer uma carteira de processos e metodologias de diagnóstico para agentes infecciosos de suínos importantes para o mercado interno e exportador. A eleição desses patógenos baseou-se na dificuldade, até então, de realizar uma investigação de agentes considerados exóticos no Brasil, como o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV) e o vírus da influenza suína (VIS). Outros agentes incluem o vírus da doença de Aujeszky, presente em rebanhos suínos domésticos de alguns estados brasileiros, porém de desconhecida epidemiologia e virulência em suínos silvestres. A

pneumonia enzoótica causada por *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh), amplamente disseminado na suinocultura brasileira e mundial, também requer métodos de diagnóstico indisponíveis em laboratórios oficiais, embora seja uma doença de certificação opcional para Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas (GRSC), segundo a IN 19, do Mapa. Para detecção de anticorpos e ácidos nucleicos desses agentes, em rebanhos comerciais ou centrais de inseminação, foram coletados soro sanguíneo, fluido oral, suabes nasais e vaginais ou prepuciais e fragmentos de órgãos suínos. Para detecção de anticorpos e agentes, as amostras foram testadas por ELISA e/ou HI (inibição da hemaglutinação) e RT-PCR (reação em cadeia da polimerase e transcriptase reversa) ou nested-PCR e, posteriormente, por imunohistoquímica e isolamento viral. Técnicas de PCR em tempo real foram implantadas para o VIS, para o vírus de influenza pandêmico (pH1N1), para o PRRSV e para o circovírus suíno tipo 2 (PCV2). Para caracterização desses agentes, como os vírus de influenza e Mh, o sequenciamento do genoma foi realizado. Os resultados deste estudo indicaram que para um diagnóstico seguro é necessário um processo ou conjunto de análises que complementem o diagnóstico laboratorial. A disponibilização dessas análises em laboratórios parceiros vai incrementar a vigilância sanitária, favorecendo uma maior competitividade da suinocultura brasileira frente a desafios sanitários atuais e potenciais.

\*Edital CNPq/Mapa/SDA Nº 064/2008 (processo nº 578102/2008-0).

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves, BR 153, km110, CEP 89700-000, Distrito de Tamanduá, Concórdia, SC, Brasil.

E-mail: janice@cnpqa.embrapa.br

<sup>2</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil.

### Avaliação da eficácia do tratamento com tripsina em oócitos maturados *in vitro* e embriões fertilizados *in vitro* expostos a sorovares de *Herpes virus bovinus* tipo 1

*Evaluation of the effectiveness of treatment with trypsin in in vitro mature oocytes and in vitro embryos exposed to type 1 Bovine herpes virus.*

D'Angelo, M.; Pavão, D. L.; Alves, M. F.; Castro, V.; Catroxo, M. H. B.

Técnicas de reprodução assistida melhoram a qualidade e produtividade de rebanhos no mundo todo e têm sido cada vez mais utilizadas. Pesquisas analisando qualidade sanitária dos rebanhos, condições de oócitos e embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* são realizadas mundialmente devido a contaminações que podem ocorrer durante as fases de produção e transferência de embriões. Nesse sentido, a técnica de produção e transferência de embriões torna-se segura desde que seguidas as normas definidas pelo manual da International Embryo Transfer Society (IETS), por meio de tratamento dos oócitos/embriões com tripsina e antibióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do tratamento com tripsina na eliminação e/ou remoção do Herpesvírus Bovino tipo 1 (BoHV-1), estirpe Colorado, em embriões murinos. A detecção viral foi feita pela n-PCR e por efeito citopático em células de linhagem estabelecida de rim bovino (MDBK). Camundongos fêmeas Swiss, com idade entre seis e oito semanas, foram superovuladas e acasaladas com machos inteiros da mesma linhagem e idade. Após 24 horas, os zigotos (n = 262) foram divididos em três grupos: grupo controle submetido à lavagem sequencial (CLS), grupo exposto ao vírus (30 µL; título 106,5 vírus/mL) e submetido à lavagem sequencial (ELS) e grupo exposto ao vírus e submetido ao tratamento com tripsina (ETT). Os zigotos e as últimas gotas dos grupos foram separados para o teste