

Comparação de diferentes protocolos para a detecção do vírus da diarreia viral bovina por RT-PCR em grupos de sangue total e de soro sangüíneo, artificialmente contaminados

Comparison of different protocols for the bovine viral diarrhea virus detection by RT-PCR in pools of whole blood and blood serum artificially contaminated

Daniela Pilz¹; Alice F. Alfieri²; Amauri A. Alfieri^{2*}

Resumo

A técnica da RT-PCR foi otimizada e avaliada para a detecção da região 5' terminal não-traduzida do genoma do vírus da diarreia viral bovina (BVDV) em amostras clínicas de bovinos, constituídas por soro sangüíneo e sangue total, artificialmente contaminadas com a estirpe NADL do BVDV. Para a otimização da técnica foram avaliados: i) dois pares de *primers*, 103 / 372 (WEINSTOCK et al., 2001) e 324 / 326 (VILCEK et al., 1994) ii) quatro métodos de extração do ácido nucléico (fenol / clorofórmio / álcool isoamílico; sílica / isotiocianato de guanidina; uma combinação dos dois métodos anteriores e TRIzol™) e iii) diferentes concentrações e composições de reagentes, tampões e tempo/temperatura das reações. Entre todas as alternativas testadas a que resultou na amplificação de um produto com 290 pb, que foi facilmente visualizado em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, foi a que empregou as seguintes condições: i) *primers* 103 e 372; ii) volume inicial e amostra clínica: 50 mL de soro sangüíneo; iii) extração do ácido nucléico: método da sílica / isotiocianato de guanidina, iv) transcrição reversa: 9 mL do ácido nucléico extraído, 1xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 60 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV, desnaturação do RNA a 97°C / 4 min e transcrição reversa a 42°C / 30 min e v) PCR: *primers* 103 / 372 com temperatura de anelamento de 59°C. A utilização da RT-PCR nas condições otimizadas nesse estudo possibilitou a amplificação da estirpe NADL do BVDV (10^{3,56} TCID₅₀) em *pools*, artificialmente contaminados, de soro sangüíneo de bovinos até a diluição de 1:160.

Palavras-chaves: Bovino, diarreia viral bovina, BVDV, RT-PCR, soro sangüíneo

¹ Aluna do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal; Nível: Mestrado), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Londrina (UEL).

² Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCA, UEL, Campus Universitário, caixa postal 6001, CEP. 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

* Autor para correspondência E-mail: alfieri@uel.br

Abstract

The RT-PCR technique was optimized and evaluated to detect the 5' untranslated region of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) from clinical samples that consisted of blood serum and whole blood artificially contaminated with the NADL strain of BVDV. To optimization of technique, the following conditions were evaluated: i) two pairs of primers, 103 / 372 (WEINSTOCK et al., 2001) and 324 / 326 (VILCEK et al., 1994), ii) four methods of nucleic acid extraction (phenol/chloroform/isoamyl alcohol; silica/guanidine isothiocyanate; a combination of the two previous methods; and TRIzol™) and iii) different concentrations and compositions of reagents and time/temperature of the reactions. Between the alternatives tested that resulted in the amplification of the 290 bp product that was easily visualized in ethidium bromide stained 2% agarose gel was that presented the following conditions: i) primers 103 and 372; ii) initial volume and clinical sample: 50 mL of blood serum; iii) extraction of nucleic acid: silica/guanidine isothiocyanate method; iv) reverse transcription: 9 mL extracted nucleic acid, 1xPCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂; 60 units of reverse transcriptase enzyme M-MLV, RNA denaturation at 97°C / 4 min, and reverse transcription at 42°C / 30 min; v) PCR: primers 103 / 372 with annealing temperature at 59°C. The utilization of RT-PCR within these optimized conditions allowed the amplification of the BVDV NADL strain (10^{3.56} TCID₅₀) from pools of artificially contaminated blood serum until the dilution 1:160.

Key words: Cattle, bovine viral diarrhoea, BVDV, RT-PCR, blood serum

Introdução

O vírus da diarréia viral bovina (*bovine viral diarrhoea virus* -BVDV-) é o agente etiológico da diarréia viral bovina (BVD), enfermidade altamente contagiosa que, na fase aguda da doença, apresenta potencial imunodepressor (POTGIETER, 1988). A importância econômica dessa virose está diretamente relacionada aos aspectos produtivos e reprodutivos, que podem incluir queda na produção de leite, decréscimo na taxa de concepção, abortamento, mumificação fetal, nascimento de bezerro fraco e aumento da taxa de mortalidade neonatal (McGOWAN et al., 1993; DUBOVI, 1994).

Tanto em rebanhos bovinos de corte quanto de leite o BVDV está associado a várias manifestações clínicas como problemas reprodutivos e entéricos e/ou respiratórios (PEDRIZET; REBHUN; DUBOVI, 1987). A infecção fetal por uma estirpe não-citopática (NCP) entre 40 e 120 dias de gestação resulta no nascimento de animal persistentemente infectado (PI), com indução de imunotolerância (BAKER, 1995), e constitui-se no elo da cadeia epidemiológica da infecção. Os animais PI quando expostos a uma nova população viral, representada pela estirpe citopática (CP) semelhante à estirpe NCP, desenvolvem a Doença das Mucosas que

caracteriza-se por baixa morbidade e letalidade próxima a 100% (HOWARD; BROWNLIE; CLARKE, 1987).

Na maioria dos países a BVD é endêmica, com soroprevalência de 60 a 85%, com 1 a 2% de animais PI (HOUE, 1999). Estudos sorológicos têm demonstrado que o BVDV encontra-se amplamente difundido no rebanho bovino brasileiro (FIGUEIREDO et al., 1997; CANAL et al., 1998).

A ampla variedade de sinais clínicos, presentes também em outras doenças infecciosas e parasitárias, dificulta o diagnóstico clínico definitivo da BVD (BROCK, 1995; TAKIUCHI et al., 2005). Em rebanhos não vacinados contra o BVDV os métodos de diagnóstico sorológico tradicionais apenas indicam a presença da infecção, e não são utilizados para o estabelecimento do diagnóstico conclusivo. A soroconversão pós-vacinal em animais imunizados, com vacinas produzidas por metodologias convencionais, não permite diferenciar os resultados sorológicos positivos ocasionados pela infecção natural, daqueles resultantes da vacinação. A presença de animais PI também pode limitar a eficiência das técnicas sorológicas. Atualmente as técnicas mais utilizadas na detecção de anticorpos específicos para o BVDV incluem a soro-

neutralização (SN) e os ensaios imunoenzimáticos (ELISA) (NISKANEN et al., 1989). Esses testes devem ser sensíveis o suficiente para evitar resultados falso-negativos, principalmente quando os títulos de anticorpos são baixos. Os sistemas de ELISA em uso atualmente no Brasil são compostos por *kits* comerciais importados e de alto custo. A SN é laboriosa, demanda estrutura de cultivo celular, e maior tempo para a conclusão dos resultados (SANDVICK, 1999).

Contudo, o diagnóstico da infecção ocasionada pelo BVDV somente poderá ser conclusivo a partir de métodos de diagnóstico etiológico. Para isto, podem ser utilizadas técnicas de isolamento viral em cultivo celular e microscopia eletrônica; identificação de antígenos virais pelas técnicas de imunofluorescência, imunoperoxidase e ELISA diretos; e identificação do genoma viral por meio de métodos moleculares como a hibridização e a reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR) (ROBERTS et al., 1991).

O isolamento viral em cultivo celular é a técnica rotineiramente empregada, porém, esse método requer a manutenção de linhagens celulares tornando o processo laborioso, demorado e de alto custo. A exigência da viabilidade da partícula viral, e conseqüentemente da sua infecciosidade, constitui outro inconveniente do isolamento viral. Os sistemas de ELISA também podem ser empregados para a detecção do BVDV e apresentam como vantagem, a não exigência de culturas celulares, além da possibilidade da conclusão dos resultados em poucas horas (NISKANEN et al., 1989). Como desvantagem, os sistemas de ELISA são empregados para o diagnóstico do BVDV em amostras biológicas provenientes de um único animal. A dependência de *kits* comerciais importados aumenta consideravelmente o custo por reação, praticamente inviabilizando a sua aplicação na triagem de rebanhos bovinos para a identificação de animais PI.

Os métodos de diagnóstico molecular, particularmente a RT-PCR, estão sendo universalmente adotados para o diagnóstico etiológico de diversas viroses animais (BÉLAK; BALLAGI-PORDÁNY, 1993). As principais vantagens dessa técnica incluem a rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da infecciosidade da partícula viral e, quando devidamente padronizada, as altas taxas de sensibilidade e especificidade (McPHERSON; TAYLOR; QUIRKE, 1994; TAKIUCHI et al., 2003, 2005). A aplicação da RT-PCR em material biológico constituído por *pools* de amostras clínicas colhidas de vários animais facilita o rastreamento da infecção em rebanhos bovinos, além de diminuir o custo do diagnóstico.

Considerando que a identificação de animais PI, bem como a sua eliminação, constitui uma das principais medidas para a profilaxia e controle da BVD, o presente trabalho teve como objetivo otimizar e avaliar a RT-PCR para a realização do diagnóstico etiológico do BVDV em *pools* de amostras clínicas constituídas por sangue total ou soro sangüíneo, artificialmente contaminados com a estirpe NADL do BVDV.

Material e Métodos

Vírus e células

A estirpe citopática NADL do BVDV foi produzida em células MDBK (*Madin Darby bovine kidney*) mantidas em meio Dulbecco modificado (D-MEM, Gibco BRL, EUA) suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, BRL, EUA) livre de micoplasmas e vírus, 55 mg/mL de gentamicina (Sigma® Co., EUA) e 2,5 mg/mL de anfotericina B (Sigma® Co., EUA). Para a produção do BVDV em cultivo celular a concentração do SFB presente no meio de cultura celular D-MEM foi reduzida para 1%. O título viral presente na suspensão foi calculado em dose infecciosa 50% para cultura de tecidos (50% *tissue culture infective doses* – TCID₅₀ –), segundo Reed e Muench (1938).

Soro-neutralização

A detecção de anticorpos contra o BVDV, após prévia inativação do soro a 56°C / 30 min, foi realizada pela microtécnica de SN, com incubação vírus/soro por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados em células MDBK mantidas a 37°C em meio D-MEM suplementado com gentamicina e anfotericina B e 10% de SFB. Para a realização da SN a concentração do SFB foi reduzida para 1%. Em todos os experimentos foram incluídos controles de vírus (100, 10 e 1 TCID₅₀); soros positivos e negativos, além de SFB isento de anticorpos para o BVDV. Todas as amostras de soro incluídas no trabalho foram analisadas quanto ao grau de toxicidade para cultivo celular. Os soros foram considerados tóxicos e, conseqüentemente descartados do experimento, quando determinavam lise celular nas cavidades onde não havia o vírus padrão. A SN foi realizada em microplacas de 96 cavidades (NUNCLON®, EUA) com 4 x 10⁴ células/cavidade e os soros testados até a diluição de 1:64. Foram consideradas como positivas as amostras que inibiram 100% do efeito citopático (ECP) de 100 TCID₅₀ da estirpe NADL do BVDV a partir da diluição 1:8 após 72 h de incubação a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Amostras clínicas

Inicialmente, alíquotas de 900 µL de soro sangüíneo e de sangue total, provenientes de bovinos soronegativos para o BVDV pela SN, foram artificialmente contaminadas com 100 µL da estirpe NADL do BVDV com o título de 10^{3,56} TCID₅₀. A partir dessas amostras, foram realizadas diluições seriadas (1:5 – 1:160) na base 2 utilizando como diluente *pools* de sangue total ou soro sangüíneo, também provenientes de bovinos isentos de anticorpos para o BVDV.

Extração do Ácido Nucléico

Alíquotas de 500 µL, 300 µL, 100 µL e 50 µL das diluições de sangue total e soro sangüíneo

contaminadas com o BVDV, com e sem a adição de tampão de lise: i) 1% Nonidet P40, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl e incubação por 10 min a temperatura ambiente; ou ii) 0,5% SDS, 1% Proteinase K (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) e incubação por 30 min a 56°C, foram submetidas à extração do ácido nucléico por quatro métodos: i) fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1), ii) sílica / isotiocianato de guanidina, iii) combinação dos métodos fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e sílica / isotiocianato de guanidina e iv) TRIzol™ (Invitrogen™, Life Technologies, EUA).

Os métodos do fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e da sílica / isotiocianato de guanidina foram, respectivamente, realizados de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989) e Boom et al (1990). A extração do RNA empregando o TRIzol™ foi realizada segundo as instruções do fabricante. A combinação dos métodos fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e sílica / isotiocianato de guanidina foi utilizada de acordo com Alfieri et al (2004), com pequenas modificações. Inicialmente as amostras foram tratadas com igual volume de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1), agitadas em vórtex e aquecidas em banho-maria a 56°C / 15 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g / 10 min e a fase aquosa foi processada em sílica / isotiocianato de guanidina, de acordo com Boom et al (1990). Ao final, o ácido nucleico foi eluído em 50 µL de água ultra-pura (MilliQ®) autoclavada e mantido a -20°C até o uso. Em todos os procedimentos de extração do RNA foram incluídas alíquotas de água ultra-pura autoclavada como controle negativo e a estirpe NADL do BVDV como controle positivo.

Oligonucleotídeos iniciadores (Primers)

Nos experimentos de otimização da RT-PCR foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). O primeiro par de *primers*, descrito por Weinstock, Bhudevi e Anthony (2001), denominado 103 *sense* (5' tag cca tgc cct tag tag gac 3' – nt 103–124) e 372 *anti-sense* (5' act cca

tgt gcc atg tac agc 3' – nt 372–392) foi desenhado a partir da seqüência da região 5' não-traduzida (5'UTR) e amplifica um produto de 290 pares de base (pb). O segundo par de *primers* avaliado, denominado panpestivírus e descrito por Vilcek et al. (1994), é representado pelo *primer* 324 *sense* (5' atg ccc wta gta gga cta gca 3' onde W=A ou T, nt 108–128) e 326 *anti-sense* (5' tca act cca tgt gcc atg tac 3' – nt 375–395) e amplifica um produto de 288 pb do mesmo gene.

Transcrição reversa – RT

Para a realização da RT foram avaliados diferentes volumes (1 µL, 3 µL, 5 µL e 9 µL) do RNA extraído, 20 pmol do *primer anti-sense* (372 ou 326), 0,25 mM de cada dNTP (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) e dois tipos de tampões: i) 1xRT-*buffer* (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) (50 mM Tris-HCl pH 8,4; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 1 mM ditioneitol) ou ii) 1xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl - Invitrogen™, Life Technologies, EUA) com concentrações crescentes de MgCl₂ (1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM). A enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen™, Life Technologies, EUA) foi incluída na reação nas concentrações de 60, 120 ou 200 unidades. O volume final de 20 µL por reação foi obtido pela adição de água ultra-pura autoclavada. Anteriormente à adição dos reagentes (RT-MIX) o RNA extraído foi desnaturado a 97°C ou 65°C / 5 min. A síntese do cDNA foi realizada em termociclador (PTC-200, MJ Research Co., EUA) sob diferentes condições de temperatura e tempo: i) 37°C / 1h, ou ii) 42°C / 30 min. Posteriormente a enzima M-MLV foi inativada a 95°C / 5 min.

Reação em cadeia pela polimerase - PCR

A PCR foi realizada em uma solução contendo 5 mL de cDNA e 45 µL de PCR-MIX constituído por 20 pmol de cada *primer* (103 / 372 ou 324 / 326), 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 unidades de *Taq* DNA

polimerase recombinante (Invitrogen™, Life Technologies, BR), 1xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1,5 mM MgCl₂ e água ultra-pura autoclavada para o volume final de 50 µL. O cDNA foi pré-desnaturado a 94°C / 4 min e mantido em banho de gelo até a adição dos reagentes. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura para os *primers* 103 / 372: i) uma etapa de 4 min / 94°C; ii) 35 ciclos de 1 min / 94°C (desnaturação), 30 s em gradiente de temperatura 57°C; 58°C; 59°C; 62°C ou 65°C (anelamento) e 1 min / 72°C (extensão) e iii) uma etapa de extensão final por 7 min / 72°C. Para os *primers* 324 / 326 as condições das reações foram as seguintes: i) uma etapa de 2 min / 94°C, ii) 40 ciclos de 1 min / 94°C, 1 min / 57°C e 2 min / 72°C e iii) uma etapa de extensão final por 7 min / 72°C.

Análise dos Produtos da RT-PCR

Aliquotas com 10 µL dos produtos da RT-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo (0,5 mg/mL) em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (90V) durante aproximadamente 30 min. O gel foi visualizado sob luz ultra-violeta (UV) e fotodocumentado em sistema digital (*Electrophoresis Documentation and Analysis System 290*, KODAK®, New York, EUA).

Perfil de restrição

A confirmação do produto amplificado na RT-PCR foi obtida pela análise do perfil de restrição com as enzimas *Hae* III e *Hinf* I (Invitrogen™, Life Technologies, EUA), utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos gerados pela clivagem enzimática foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo (0,5 mg/mL), visualizados sob luz UV e fotodocumentado.

Resultados e Discussão

Entre as alternativas testadas para a detecção do RNA do BVDV em amostras clínicas representadas por *pools* de sangue total e de soro sanguíneo artificialmente contaminados, a que resultou na melhor amplificação de um produto com 290 pb, que foi facilmente visualizado em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, empregou as seguintes condições: i) volume inicial da amostra clínica: 50 µL de soro sanguíneo; ii) extração do ácido nucléico: método da sílica / isotiocianato de guanidina, iii) transcrição reversa: 9 µL do ácido nucléico extraído; 20 pmol do *primer* 372; 0,25 mM de cada dNTP, 1xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 60 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV, desnaturação do RNA a 97°C / 4 min e transcrição reversa a 42°C / 30 min e iv) PCR: *primers* 103 / 372 (WEINSTOCK; BHUDEVI; ANTHONY, 2001) com temperatura de anelamento de 59°C.

Entre os dois tipos avaliados de material clínico, artificialmente contaminados com a estirpe NADL do BVDV, o soro sanguíneo apresentou resultados positivos até a diluição 1:160 (Figura 1), enquanto que em amostras de sangue total somente foi possível positividade até a diluição 1:20. A menor sensibilidade do sistema utilizando sangue total como material clínico para a detecção do RNA do BVDV, em amostras constituídas por *pool*, pode ser justificada devido à presença de inibidores da PCR em sangue total como hemoglobina, DNA de leucócitos e a presença de hemólise (WILSON, 1997).

Em animais com quadro clínico de infecção aguda, e também naqueles persistentemente infectados, o BVDV pode ser encontrado tanto no interior de leucócitos quanto livre no sangue. Essa característica possibilita a utilização do soro como amostra biológica para a detecção do BVDV, além de apresentar como vantagem a eliminação de uma série de prováveis inibidores presentes no sangue total (BROCK, 1995). O sangue apresenta ainda como desvantagem a necessidade de ser processado rapidamente após a colheita, inviabilizando a estocagem por tempo prolongado. Em contrapartida, o soro pode ser estocado em temperatura de congelamento. Nas

situações que necessitam o diagnóstico etiológico o rebanho bovino pode ser proveniente de regiões distantes do laboratório de diagnóstico, e fatores como transporte e conservação das amostras podem ser responsáveis pelo insucesso do diagnóstico. A possibilidade da conservação da amostra por congelamento, como no caso do soro sanguíneo, além de permitir a estocagem do material biológico por período de tempo superior ao sangue, determina ainda maior facilidade no transporte e dificulta a contaminação da amostra.

Devido ao excesso de proteínas presentes no soro, a extração do ácido nucléico pelos métodos do fenol / clorofórmio / álcool isoamílico, bem como a sua combinação com a sílica / isotiocianato de guanidina ocasionou, já na primeira etapa da extração, a formação de uma fase protéica muito espessa que praticamente determinou a eliminação da fase aquosa. Em ambos os métodos essa primeira fase é utilizada para a continuidade da extração, tanto para a precipitação com etanol quando utiliza-se o fenol / clorofórmio / álcool isoamílico isoladamente, quanto para a inclusão da sílica, quando emprega-se a combinação dos dois métodos. Com o método TRIzol™, também foram obtidos resultados positivos. Porém, além da menor sensibilidade, pois somente foi possível a amplificação do produto até a diluição de 1:20, a qualidade do produto final não foi adequada, sendo observados sinais de degradação do ácido nucléico e bandas extras. O método descrito por Boom et al. (1990) que utiliza uma matriz de sílica e o isotiocianato de guanidina proporcionou a amplificação do produto nas maiores diluições, até 1:160, além de melhor qualidade uma vez que não foram observados sinais de degradação do ácido nucléico e tão pouco a presença de bandas extras. O método da sílica / isotiocianato de guanidina apresenta como vantagens adicionais, em relação aos anteriores, a facilidade e rapidez de execução e a não geração de resíduos tóxicos, uma vez que o isotiocianato de guanidina pode ser neutralizado com 10 M NaOH anteriormente ao descarte. O isotiocianato de guanidina é ainda uma potente nuclease e sua ação sobre RNases protege o RNA fita simples do BVDV (FANSON; OSMACK; BISCEGLIE, 2000).

A utilização do tampão da enzima M-MLV 1xRT-*buffer* (50 mM Tris-HCl pH 8,4; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 1 mM ditioneitol), bem como a temperatura e o tempo (37°C / 1h) ideais para a ação da enzima, preconizados pelo fabricante, gerou resultados inconsistentes como falso-negativos e resultados positivos com fraca intensidade. Como alternativa, optou-se por alterar a constituição do tampão da enzima para 1xPCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), utilizar o MgCl₂ na concentração de 1,5 mM e alterar as condições de temperatura e tempo de incubação para 42°C / 30 min. Com esse novo protocolo para a transcrição reversa observou-se repetibilidade nos resultados positivos, que caracterizaram-se pela amplificação de produtos específicos com forte intensidade em gel de agarose.

Com freqüência as técnicas de biologia molecular, como a RT-PCR, utilizam reagentes e tampões “prontos para o uso” que facilitam a execução da técnica, diminuindo a margem de erro gerada pela diversidade de reagentes incluídos na reação. Porém, variáveis como: i) tipo do ácido nucléico (RNA/DNA), ii) tamanho do produto amplificado, iii) porcentagem de C-G (citosina / guanina) no *amplicon*, iv) formação de *hetero-duplex*, e v) origem da amostra clínica analisada; podem interferir no resultado final da reação (ANDRE et al., 1995; HYNDMAN et al., 1998; LETELLIER; KERKHOFS, 2003).

Nesse trabalho ficou evidente a real necessidade da padronização dos reagentes incluídos na RT-PCR uma vez que a utilização de um tampão na reação de transcrição reversa, constituído pelos mesmos sais, porém em concentrações diferentes, além da alteração do tempo e temperatura da reação, proporcionaram resultados satisfatórios que permitiram a continuidade dos trabalhos.

Para a etapa da PCR os *primers* 103 / 372 descritos por Weinstock; Bhudevi; Anthony (2001) quando utilizados em temperatura de anelamento de 59°C determinaram resultados muito superiores aos *primers* 324 / 326, denominados *panpestivirus* e amplamente utilizados para o diagnóstico do BVDV.

Apesar de hibridizarem em posições muito próximas na região 5'-UTR, os *primers* 324 / 326 apresentaram resultados de baixa consistência quando foi reproduzida a metodologia proposta pelos autores que os descreveram. A sensibilidade da reação empregando esses *primers* também foi muito inferior em relação aos *primers* 103 / 372, que amplificaram o produto esperado (290 pb) em maior concentração, gerando bandas de maior intensidade de coloração em gel de agarose. Weinstock; Bhudevi; Anthony (2001), utilizaram a temperatura de anelamento de 62°C para os *primers* 103 e 372. Porém, no presente estudo essa temperatura gerou resultados inconclusivos, ocasionando redução tanto na sensibilidade quanto na especificidade, com a amplificação de produtos inespecíficos. Após a realização da técnica em gradiente de temperatura de anelamento observou-se a amplificação do produto esperado em maior quantidade e melhor qualidade na temperatura de 59°C. Esse resultado pode ter sido gerado pelo sistema empregado por Weinstock; Bhudevi; Anthony (2001), onde as reações de transcrição reversa e de PCR foram realizadas em apenas um passo (*single step*), com a utilização de *kit* (*Gene Amp EZ rTth RNA PCR*, Perkin-Elmer™, EUA). O sistema otimizado nesse estudo, conforme descrito anteriormente, foi idealizado em duas etapas (*two steps*), com as reações da transcrição reversa e da PCR realizadas individualmente.

A caracterização do produto com 290 pb da região 5'-UTR da estirpe NADL do BVDV, bem como da amostra de soro sanguíneo artificialmente contaminado na diluição 1:40, gerou fragmentos de 242 e 48 pb com a enzima *Hae* III. Conforme deduzido pela análise *in silico*, o produto não apresentou sítio de restrição para a enzima *Hinf* I (Figura 2).

Para o diagnóstico etiológico das várias formas de manifestação clínica da BVD, o isolamento viral em cultivo celular é considerado a técnica padrão. Entretanto, esse método de diagnóstico é laborioso, demorado, e nas infecções ocasionadas por estirpes NCP, que correspondem a 95% das situações, a caracterização do isolamento viral somente pode ser obtida por meio do uso de técnicas complementares

como a imunofluorescência ou a imunoperoxidase. Com isso, o diagnóstico definitivo, em raras ocasiões, pode ser obtido em período inferior a 15 dias (NISKANEN et al., 1989; EDWARDS, 1990).

Vários métodos de ELISA foram desenvolvidos com o objetivo principal de redução no período de tempo necessário para a conclusão de resultados, particularmente em estudos relativos à identificação de animais PI em rebanhos bovinos. Porém, o ELISA é realizado em amostras biológicas (soro sanguíneo, plasma ou sangue total) individuais o que aumenta o custo final do diagnóstico, podendo inclusive inviabilizar o seu uso em situações de rebanhos onde muitos animais devem ser avaliados (ROSSMANITH et al., 2001).

Para contornar os inconvenientes dos métodos de diagnóstico etiológico descritos anteriormente, a RT-PCR tem-se tornado uma ferramenta indispensável, particularmente devido a sua alta sensibilidade, que possibilita a detecção de seqüências genômicas mesmo em amostras nos quais os microrganismos encontram-se em título muito baixo, inativados ou mesmo em amostras altamente diluídas.

No presente trabalho a importância da otimização da RT-PCR, antes de sua utilização em larga escala como diagnóstico etiológico, ficou bem caracterizada.

O uso tanto do tampão da enzima transcriptase reversa M-MLV, fornecido pelo fabricante, quanto das condições de tempo e temperatura preconizadas para a enzima, geraram resultados com baixa repetibilidade e qualidade, além de falso-negativos. Após a introdução de modificações que envolveram, particularmente, a constituição do tampão, a concentração e as condições de tempo e temperatura de reação da enzima M-MLV obteve-se maior sensibilidade e qualidade das reações de amplificação.

A RT-PCR utilizando os *primers* descritos por Weinstock; Bhudevi; Anthony (2001) e otimizada nesse estudo demonstrou ser uma estratégia de diagnóstico etiológico do BVDV capaz de proporcionar resultados conclusivos em período de tempo inferior ao isolamento viral. Devido a maior sensibilidade, com relação aos métodos anteriormente descritos, a RT-PCR apresenta ainda a vantagem adicional de, além de poder ser utilizada em amostras individuais, ser realizada em soros sanguíneos na forma de *pool*, constituído por amostras provenientes de até 160 animais, proporcionando redução no custo final do diagnóstico. Essa estratégia facilita tanto o diagnóstico da forma aguda da infecção quanto a identificação de animais PI em grandes rebanhos, característica freqüente nos sistemas de produção, particularmente de corte, da bovinocultura brasileira.

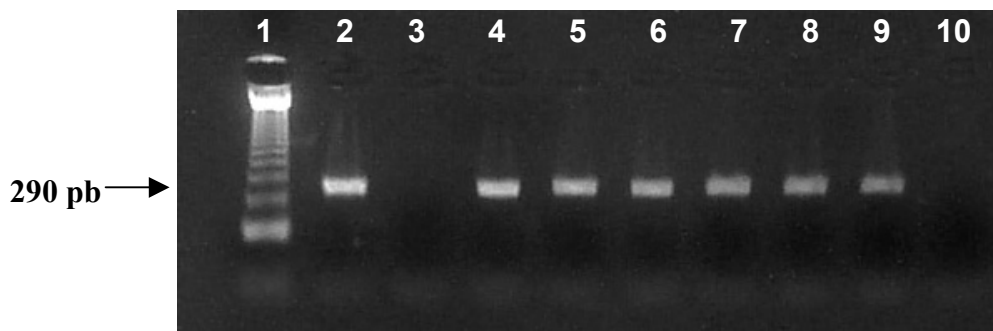


Figura 1. Análise por eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo dos produtos (290 pb) amplificados pela RT-PCR em *pools* de soros sanguíneos bovino, artificialmente contaminados com a estirpe NADL do vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 123 pb *ladder* (Invitrogen™, Life Technologies, EUA); Canaleta 2: estirpe NADL do BVDV; Canaleta 3: soro sanguíneo proveniente de bovino soronegativo para o BVDV; Canaletas 4 a 9: diluições (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160, respectivamente) de *pools* de soros sanguíneos artificialmente contaminados com a estirpe NADL do BVDV; Canaleta 10: água ultra-pura (MilliQ®) autoclavada.

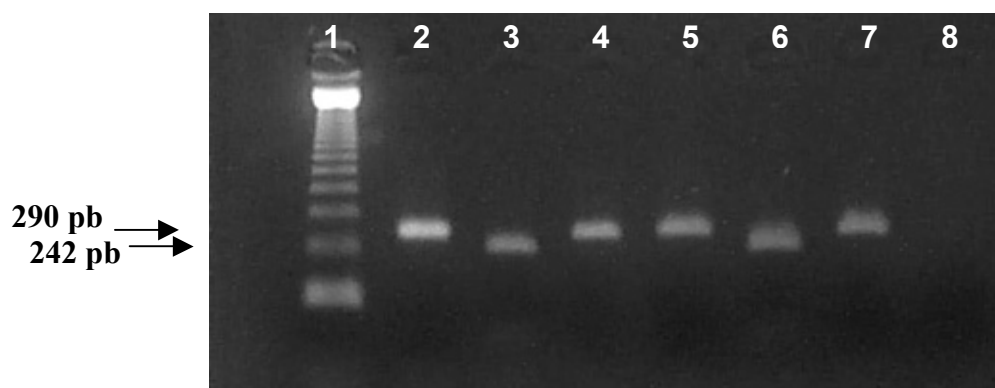


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo dos produtos amplificados pela RT-PCR para a detecção da estirpe NADL do vírus da diarreia viral bovina (BVDV), analisados com enzimas de restrição *Hae* III e *Hinf* I. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular 123 pb *ladder* (Invitrogen™, Life Technologies, EUA); Canaleta 2: estirpe NADL do BVDV; Canaletas 3 e 4: estirpe NADL do BVDV analisada com as enzimas *Hae* III e *Hinf* I respectivamente; Canaleta 5: diluição 1:40 do *pool* de soro sanguíneo artificialmente contaminado; Canaletas 6 e 7: diluição 1:40 de *pool* de soro sanguíneo artificialmente contaminado, analisado com as enzimas *Hae* III e *Hinf* I, respectivamente; Canaleta 8: água ultra-pura (MilliQ^o) autoclavada.

Agradecimentos

Os recursos financeiros utilizados para a realização deste trabalho foram obtidos nas seguintes agências de fomento à pesquisa: CNPq, CAPES e Fundação Araucária (FAP/PR).

Alfieri, A.A. é bolsista de produtividade científica do CNPq

Referências

ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 99, p. 167-173, 2004.

ANDRE, L.; HAMEL, M.; DEANNE W.; NAYAR, G. P. S. Rapid detection of bovine viral diarrhea virus by using RNA extracted directly from assorted specimens and one-tube reverse transcription PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 33, p. 287-291, 1995.

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

BÉLAK, S.; BALLAGI-PORDÁNY. A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Veterinary Research Communications*, Amsterdam, v. 17, p. 55-72, 1993.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM DILLEN, P. M. E.; NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BROCK, K. V. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infections. *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 11, p. 549-561, 1995.

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

DUBOVI, E. J. Impact of bovine diarrhea virus on reproductive performance in cattle. *The Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, Philadelphia, v. 10, p. 503-514, 1994.

EDWARDS, S. The diagnosis of bovine virus diarrhoea-mucosal disease in cattle. *International Office des Epizooties*, Paris, v. 9, p. 115-130, 1990.

FANSON, B. G.; OSMACK, P.; BISCEGLIE, A. M. D. A comparison between the phenol-chloroform method of RNA extraction and the QIAamp viral RNA kit in the extraction of hepatitis C and GB virus-C / hepatitis G viral RNA from serum. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 89, p. 23-27, 2000.

FIGUEIREDO, H. C. P.; VIEIRA, P. R.; LAGE, A. P.; LEITE, R. C. Prevalência de anticorpos contra o vírus da diarreia bovina a vírus em Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 21, p. 11-15, 1997.

- HOUE, H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) infections. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 64, p. 89-107, 1999.
- HOWARD, C. J.; BROWNLIE, J.; CLARKE, M. C. Comparison by the neutralization assay of pairs of non-cytopathogenic and cytopathogenic strains of bovine virus diarrhoea virus isolated from cases of mucosal disease. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 13, p. 361-869, 1987.
- HYNDMAN, L.; VILCEK, S.; CONNER, J.; NETTLETON, P. F. A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhoea virus in fluids from aborted fetuses. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 71, p. 69-76, 1998.
- LETELLIER, C.; KERKHOFS, P. Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 114, p. 21-27, 2003.
- McGOWAN, M. R.; KIRKLAND, P. D.; RICHARDS, S. G. E.; LITTLEJOHNS, I. R. Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. *Veterinary Record*, London, v. 133, p. 39-43, 1993.
- McPHERSON, Q. P.; TAYLOR, G. R.; QUIRKE, P. *PCR a practical approach*. Oxford: Information Press, 1994, 247 p.
- NISKANEN, R.; ALENIUS, S.; LARSSON, B.; JUNTTI, N. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. *Journal of Veterinary Medicine Séries B*, Berlin, v. 36, p. 113-118, 1989.
- PEDRIZET, J. A.; REBHUN, W. C.; DUBOVI, E. J. Bovine viral diarrhoea: clinical syndromes in dairy herds. *Cornell Veterinarian*, Ithaca, v. 77, p. 46-74, 1987
- POTGIETER, L. N. D. Immunosuppression in cattle as a result of bovine diarrhoea virus-infection. *Agri-Practice*. Santa Bárbara, v. 9, p. 7-14, 1988.
- REED, R. H.; MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Hygiene*, Baltimore, v. 27, p. 493-497, 1938.
- ROBERTS, K. L.; COLLINAS, J. K.; CARMAN, J.; BLAIR, C. D. Detection of cattle infected with bovine viral diarrhoea virus using nucleic acid hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Columbia, v. 3, p. 10-15, 1991.
- ROSSMANITH, W.; VILCEK, S.; WENZL, H.; ROSSMANITH, E.; LOITSCH, A.; DURKOVIC, B.; STROJNY, L.; PATON, D. J. Improved antigen and nucleic acid detection in a bovine virus diarrhoea eradication program. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 81, p. 207-218, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANDVICK, T. Laboratory diagnostic investigations for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. *Veterinary Microbiology*, Amsterdam, v. 64, p. 123-134, 1999.
- 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.
- TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine herpesvirus type 1 abortions detected by a semi nested-PCR in Brazilian cattle herds. *Research in Veterinary Science*, London, v. 78, n. 4, p. (prelo), 2005.
- VILCEK, S.; 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. *Archives of Virology*, New York, v. 136, p. 309-323, 1994.
- WEINSTOCK, D.; BHUDEVI, B.; ANTHONY, E. C. Single-tube single-reverse transcriptase PCR assay for detection of bovine viral diarrhoea virus in pooled bovine serum. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 39, p. 343-346, 2001.
- WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 63, p. 3741-3751, 1997.